

Humboldt-Universität zu Berlin

[PDF-VERSION]



DISSERTATION IM FACH BIOLOGIE

Untersuchungen zur Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und zur Prozessierung des Amyloid- Vorläuferproteins APP in Astrozyten

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Dipl.-Ing. (FH) Michaela Kernekewisch
geboren am 21.09.1967 in Berlin

Dekan der Fakultät

Prof. Dr. J. P. Rabe

Gutachter : 1. Prof. Dr. R. Ehwald
2. Prof. Dr. H. Bielka
3. PD Dr. T. Bunte

eingereicht: 18.09.1998

Datum der Promotion: 22.01.1999

ZUSAMMENFASSUNG

Neben aktivierten Astrozyten weisen zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren, die in der Nähe amyloidogener Ablagerungen im Hirn des Alzheimer-Patienten auftreten, auf eine Alzheimer-assoziierte Neuroinflammation hin, die an der Ausprägung der Neurodegeneration ursächlich beteiligt sein kann. Bisher ist die Bedeutung aktivierter Astrozyten für die Alzheimer-Pathogenese wenig untersucht worden. Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1, da es mit amyloidogenen Ablagerungen und Astrozyten assoziiert vorliegt. Um einen ersten Hinweis auf eine mögliche pathophysiologische Rolle des ICAM-1 in der Alzheimer-assoziierten Neuroinflammation zu erhalten, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die astrozytäre ICAM-1-Expression in Abhängigkeit unterschiedlicher Mitogene untersucht, die für die Alzheimer-Pathogenese von Bedeutung sind. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, daß Astrozyten, die mit den Zytokinen IL1 β , TNF α und TNF α mit IFN γ behandelt wurden, ihre ICAM-1-Expression verstärkten. Es konnte erstmals gezeigt werden, daß eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Forskolin, Rolipram und Prostaglandine die Zytokin-verstärkte ICAM-1-Expression verminderte. Allerdings konnte eine schon bestehende astrozytäre Aktivität durch cAMP-erhöhende Substanzen nicht beeinflußt werden. Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß die astrozytäre ICAM-1-Expression nicht durch das Amyloid β -Protein ausgelöst oder verstärkt wird, dagegen konditionierte Medienüberstände A β -aktivierter Mikroglia einen starken Einfluß auf die astrozytäre Aktivität ausüben.

Im zweiten Teil dieser Arbeit ist die Untersuchung aktivierter Astrozyten in der Alzheimer-assoziierten Amyloidogenese beschrieben, die im Zusammenhang mit der amyloidogenen Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins APP steht. Bisher standen Neurone als Hauptproduzenten des Amyloid β -Proteins im Vordergrund der Alzheimer-Forschung. Da jedoch verschiedene Veröffentlichungen darauf hinweisen, daß Astrozyten ebenfalls eine direkte Rolle in der Entstehung der amyloidogenen Ablagerungen spielen können, wurde die amyloidogene APP-Prozessierung aktivierter Astrozyten untersucht. Neben vergleichenden Analysen der astrozytären und neuronalen APP-Prozessierung konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, daß sich die APP-Prozessierung aktivierter Astrozyten zugunsten des nicht-amyloidogenen Prozessierungsweges verlagert, d.h. aktivierte Astrozyten verringerten die Sekretion des A β -Proteins. Ein charakteristisches Merkmal aktivierter Astrozyten ist eine verstärkte α -Sekretaseaktivität bei der APP-Prozessierung. Astrozyten, die mit den Zytokinen IL1 β , TNF α und TNF α mit IFN γ aktiviert wurden, akkumulierten nicht-amyloidogene C-terminale Fragmente, sekretierten verstärkt sekretorisches APP nach α -Sekretaseaktivität und zeigten eine verringerte A β -Sekretion bei gleichzeitig verstärkter Sekretion des nicht-amyloidogenen p3-Fragmentes.

Abschließend wurde die pathophysiologische Bedeutung der Astrozyten in der Alzheimer-Pathogenese im Zusammenhang mit den erzielten Ergebnissen aus dieser Arbeit und mit den Befunden anderer Forschungsgruppen diskutiert und ein Modell über die zellulären, neuroinflammatorischen Vorgänge in der Alzheimer-Pathogenese entwickelt.

Schlagwörter :

Astrozyten, Alzheimer-Krankheit, Amyloid, ICAM-1

ABSTRACT

Activated astrocytes, number of cytokines and growth factors are associated with amyloidogenic deposits in the brain of Alzheimer-patients, pointed to an Alzheimer-associated neuroinflammation, that could be involved in the progression of the neurodegeneration. So far the implication of activated astrocytes in the pathogenesis of Alzheimer's disease is not clear. In this connection the adhesion molecule ICAM-1 was of particularly interest, because it is associated with astrocytes and amyloidogenic deposits. To get insights in a possible pathophysiological role of ICAM-1 in the Alzheimer-associated neuroinflammation, in the first part of this thesis the astrocytic expression of ICAM-1 was investigated dependent on different mitogens, that are relevant to the pathogenesis of Alzheimer's disease. It was shown that the expression of ICAM-1 was enhanced in astrocytes treated with the cytokines IL1 β , TNF α and the combination TNF α with IFN γ . It was shown that an elevation of intracellular concentration of cAMP by forskolin, rolipram and prostaglandines results in an suppressed cytokine-stimulated ICAM-1 expression. But it was impossible to reduce an existing astrocytic activity by these cAMP-elevating agents. Within the scope of additional investigations it was shown that the expression of ICAM-1 was not induced by the amyloid β -peptide, whereas the ICAM-1 expression was strongly enhanced by conditioned media of A β -activated microglia.

In the second part of this thesis the investigation of activated astrocytes in the Alzheimer-associated amyloidogenesis is described, the astrocytic processing of the amyloid precursor protein (APP). So far it is believed that the neurons are the main producers of the amyloid β -peptide. But different publications pointed to the possibility that astrocytes could play a direct role in the generation of the amyloidogenic deposits. From this reason the amyloidogenic processing of APP was investigated in activated astrocytes. Besides comparative study of astrocytic and neuronal APP processing it was first shown that activated astrocytes practise more the non-amyloidogenic pathway of APP processing. A characteristic hallmark of activated astrocytes is an increased activity of α -secretase. Astrocytes that are activated by the cytokines IL1 β , TNF α or TNF α with IFN γ showed an accumulation of non-amyloidogenic C-terminal fragments, increased APP-secretion followed by α -secretase activity, decreased A β -secretion and enhanced p3-secretion.

In conclusion the pathophysiological role of astrocytes in the pathogenesis of Alzheimer's disease was discussed leading to a model of cellular neuroinflammatory events in the pathogenesis of Alzheimer's disease.

keywords :

astrocytes, Alzheimer's disease, amyloid, ICAM-1

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	II
Abstract.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1. DIE ALZHEIMER-KRANKHEIT	1
1.2. DAS AMYLOID UND SEIN VORLÄUFERPROTEIN APP	2
1.3. GENETISCHE URSACHEN DER ALZHEIMER-KRANKHEIT	5
1.4. PATHOPHYSIOLOGISCHE PROZESSE DER ALZHEIMER-KRANKHEIT	7
1.5. ZIELSETZUNG	10
2. MATERIAL	11
2.1. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	11
2.2. REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR	11
2.3. ENZYME UND ANTIKÖRPER.....	12
2.4. MOLMASSENSTANDARDS	13
2.5. ZELLKULTURMEDIENTEN UND ZUSÄTZE.....	13
2.6. BAKTERIENMEDIENTEN	14
2.7. BAKTERIENSTÄMME	14
2.8. ZELLINIEN	14
2.9. TIERE	14
2.10. PLASMIDE	14
3. METHODEN	16
3.1. MIKROBIOLOGISCHE TECHNIKEN	16
3.1.1. <i>Herstellung kompetenter Zellen.....</i>	<i>16</i>
3.1.2. <i>Transformation von Bakterien.....</i>	<i>16</i>
3.2. DNA-TECHNIKEN	16
3.2.1. <i>Präparation von Plasmid-DNA.....</i>	<i>16</i>
3.2.2. <i>DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....</i>	<i>17</i>
3.2.3. <i>Elektrophoretische Auftrennung der DNA.....</i>	<i>17</i>
3.3. ZELLKULTUR-TECHNIKEN	17
3.3.1. <i>Isolierung und Kultivierung primärer Astrozyten.....</i>	<i>17</i>
3.3.2. <i>Isolierung und Kultivierung primärer Neurone</i>	<i>18</i>
3.3.3. <i>Kultivierung von Zelllinien.....</i>	<i>19</i>
3.3.4. <i>Kultivierung stabil transfizierter Zelllinien</i>	<i>19</i>
3.3.5. <i>Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....</i>	<i>20</i>
3.3.6. <i>Auftauen kryokonservierter eukaryotischer Zellen</i>	<i>20</i>
3.3.7. <i>Metabolische Markierung von Zellen mit L-[³⁵S]-Methionin.....</i>	<i>20</i>
3.3.8. <i>Bestimmung der Zellvitalität durch Messung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (MTS-Test)</i>	<i>20</i>
3.3.9. <i>Transfektion eukaryotischer Zellen.....</i>	<i>21</i>
3.3.10. <i>Behandlung der Zellen mit Substanzen.....</i>	<i>21</i>

3.4.	PROTEIN-ANALYTIK	22
3.4.1.	Aufarbeitung des Gewebematerials.....	22
3.4.2.	Aufarbeitung des Zellkulturmaterials	22
3.4.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	22
3.4.4.	Proteinfällung mit Aceton.....	23
3.4.5.	Immunpräzipitation radioaktiv markierter Proteine	23
3.4.6.	Immunpräzipitation nicht-radioaktiv markierter Proteine	24
3.4.7.	Herstellung von anti-IgG-Maus-gekoppelter Protein A-Sepharose	24
3.4.8.	Tris-/Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	24
3.4.9.	Tris-/Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	25
3.4.10.	Tris-/Bicin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem NuPage-System.....	26
3.4.11.	Tris-/Bicin-/Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	27
3.4.12.	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Blue.....	28
3.4.13.	Autoradiographie mit Phosphorimager	28
3.4.14.	Western-Transfer-Analyse (Western-Blot).....	28
3.4.15.	Nachweis von Prostaglandin E2.....	29
3.4.16.	ICAM-1-ELISA	29
3.4.17.	Nachweis sekretorischer alkalischer Phosphatase	30
3.4.18.	Immunzytochemischer Nachweis des ICAM-1	30
4.	ERGEBNISSE	31
4.1.	UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION DES INTERZELLULÄREN ADHÄSIONSMOLEKÜLS ICAM-1 IN ASTROZYTEN	31
4.1.1.	Übersicht und Fragestellung.....	31
4.1.2.	ICAM-1 als Marker für die astrozytäre Aktivität	31
4.1.3.	Quantifizierung des ICAM-1 durch einen Zell-basierenden ELISA	33
4.1.4.	Astrozytäre ICAM-1-Expression in Abhängigkeit unterschiedlicher Zytokin- Konzentrationen.....	34
4.1.5.	Zeitverlauf der Zytokin-verstärkten ICAM-1-Expression.....	35
4.1.6.	Astrozytäre ICAM-1-Expression unter Einfluß verschiedener Mitogene	36
4.1.7.	Astrozytäre ICAM-1-Expression unter Einfluß von physiologischem A β -Protein ..	39
4.1.8.	Astrozytäre ICAM-1-Expression unter Einfluß konditionierter Medienüberstände aktivierter Mikroglia	40
4.1.9.	Pharmakologische Beeinflussung der astrozytären ICAM-1-Expression	41
4.1.10.	Physiologische Beeinflussung der astrozytären ICAM-1-Expression.....	44
4.1.11.	Astrozytäre Sekretion des Prostaglandin E2	45
4.2.	UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION UND PROZESSIERUNG DES AMYLOID- VORLÄUFERPROTEINS APP IN ASTROZYTEN.....	47
4.2.1.	Übersicht und Fragestellung.....	47
4.2.2.	APP-Prozessierung in Astrozyten.....	47
4.2.3.	Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen A β -Protein	50
4.2.4.	Nachweis der β -Sekretaseaktivität in transfizierten Astrozyten.....	51
4.2.5.	Nachweis der γ -Sekretaseaktivität in transfizierten Astrozyten	53
4.2.6.	APP-Prozessierung stabil transfizierter H4-Zellen	55
4.2.7.	Untersuchung der APP-Prozessierung aktivierter Astrozyten.....	57
5.	DISKUSSION.....	62
5.1.	ASTROZYTÄRE EXPRESSION DES INTERZELLULÄREN ADHÄSIONSMOLEKÜLS ICAM-1	62
5.1.1.	Astrozytäre Zelllinien als Zellkulturmodell für die Analyse der astrozytären ICAM-1- Expression	62
5.1.2.	Astrozytäre ICAM-1-Expression unter Einfluß verschiedener Mitogene	62
5.1.3.	Astrozytäre ICAM-1-Expression unter Einfluß von A β -Protein	63

5.1.4.	<i>Astrozytäre ICAM-1-Expression unter Einfluß konditionierter Medienüberstände aktivierter Mikroglia</i>	63
5.2.	SIGNALTRANSDUKTIONSWEG DER ASTROZYTÄREN ICAM-1-EXPRESSION	64
5.2.1.	<i>Pharmakologische Beeinflussung der astrozytäre ICAM-1-Expression</i>	64
5.2.2.	<i>Physiologische Beeinflussung der astrozytären ICAM-1-Expression</i>	64
5.2.3.	<i>Unterschiedliche Hemmung der IL1β- und TNFα-verstärkten ICAM-1-Expression</i>	65
5.3.	ASTROZYTÄRE EXPRESSION UND PROZESSIERUNG DES AMYLOID-VORLÄUFER-PROTEINS APP	66
5.3.1.	<i>Amyloidogene APP-Prozessierung astrozytärer Zellen</i>	66
5.3.2.	<i>Amyloidogene APP-Prozessierung aktivierter Astrozyten</i>	67
5.4.	MÖGLICHE PATHOPHYSIOLOGISCHE ROLLE AKTIVIERTER ASTROZYTEN IN DER ALZHEIMER-PATHOGENESE	67
5.4.1.	<i>Rekrutierung von Mikroglia als pathophysiologische Rolle des ICAM-1</i>	67
5.4.2.	<i>Astrozytäre Sekretion von Plaque-katalysierenden Substanzen</i>	68
5.4.3.	<i>Störung der Hirnhomöostase</i>	69
5.5.	MODELL ÜBER ZELLULÄRE, NEUROINFLAMMATORISCHE VORGÄNGE IN DER ALZHEIMER-PATHOGENESE	69
5.6.	THERAPEUTISCHE ANSATZPUNKTE UND AUSBLICK	71
6.	LITERATURVERZEICHNIS	72
7.	Anhang	82
	Abkürzungsverzeichnis	
	DANKSAGUNG	
	Lebenslauf	
	Erklärung	87

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 : Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Amyloid-Vorläuferproteins
- Abb. 2 : Schematische Darstellung der APP-Prozessierungswege
- Abb. 3 : Darstellung der A β -Region mit den verschiedenen Mutationen im APP-Gen
- Abb. 4 : Immunhistochemische Dreifachfärbung eines senilen Plaques
- Abb. 5 : Struktur des Vektors pCEP4
- Abb. 6 : Immunzytochemische Detektion von ICAM-1 in Astrozyten
- Abb. 7 : Immunpräzipitation des ICAM-1
- Abb. 8 : Expression des ICAM-1 in Abhängigkeit von der IL1 β - und TNF α -Konzentration
- Abb. 9 : Zeitverlauf der Zytokin-verstärkten ICAM-1-Expression
- Abb. 10 : Einfluß verschiedener Mitogene auf die Expression des ICAM-1 in CCF-STTG1-Zellen
- Abb. 11 : Einfluß verschiedener Mitogene auf die Expression des ICAM-1 in H4-Zellen
- Abb. 12 : Einfluß des A β -Proteins auf die astrozytäre ICAM-1-Expression
- Abb. 13 : Einfluß konditionierter Medienüberstände aktivierter Mikroglia auf die astrozytäre ICAM-1-Expression
- Abb. 14 : Einfluß von Enzym-Hemmstoffen auf die astrozytäre ICAM-1-Expression
- Abb. 15 : Einfluß von Prostaglandinen auf die astrozytäre ICAM-1-Expression
- Abb. 16 : PGE₂-Sekretion aktivierter Astrozyten
- Abb. 17 : Nachweis proteolytischer APP-Fragmente von Astrozyten und Neuronen
- Abb. 18 : Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen A β -Protein
- Abb. 18 : Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen A β -Protein
- Abb. 19 : APP-Prozessierung transfizierter Astrozyten und Neurone
- Abb. 20 : A β -Sekretion transfizierter Astrozyten und Neuronen
- Abb. 21 : Verhältnis [A β (1-40):p3] transfizierter Astrozyten und Neuronen
- Abb. 22 : APP-Prozessierung stabil transfizierter H4-Zellen
- Abb. 23 : APP-Prozessierung aktivierter H4/APP695sw-Zellen – Analyse der Zellysate
- Abb. 24 : APP-Prozessierung aktivierter H4/APP695sw-Zellen – Analyse der konditionierten Medienüberstände
- Abb. 25 : APP-Prozessierung aktivierter H4/APP695sw-Zellen
- Abb. 26 : Hemmung der räumlichen Ausbreitung der Astrozyten-Aktivierung
- Abb. 27 : A β -Sequenz des Menschen und der Maus
- Abb. 28 : Modell über zelluläre, neuroinflammatorische Prozesse in der Alzheimer-Pathogenese

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 : Genetische Ursachen der Alzheimer-Krankheit und deren Einfluß auf die Entstehung des A β -Proteins
- Tab. 2 : Charakteristische Marker inflammatorischer Prozesse im Hirn von Alzheimer-Patienten
- Tab. 3: Zusammensetzung der Tris-/Tricin-Trenngele
- Tab. 4 : Ermittlung der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten des ICAM-1-ELISA's
- Tab. 5 : Übersicht der verwendeten Hemmstoffe und Aktivatoren von Enzymen

1. Einleitung

Bis zum Ende des 19. Jahrhunderts wurde den Neuronen die Hauptrolle bei den physiologischen Prozessen des Gehirns zugeschrieben. Mit der Entdeckung der Astrozyten hat sich jedoch diese Ansicht gewandelt. Anfangs wurden sie noch als uninteressanter „Nervenkitt“ beschrieben, ein Bindegewebe zwischen den Neuronen („*Neuroglia*“). Der größte Teil des Gehirnvolumens besteht jedoch aus nicht-neuronalen Zellen, zu denen neben den Astrozyten auch die Mikroglia und Oligodendrozyten zählen. Im Gegensatz zu den Astrozyten und Oligodendrozyten, die sich wie die Neurone aus dem ektodermalen Keimblatt entwickeln, sind Mikroglia mesodermalen Ursprungs.

Astrozyten erfüllen neben einer Schlüsselrolle bei der Embryonalentwicklung auch metabolische und neurotrophische Funktionen durch Aufnahme und Metabolisierung von Neurotransmittern, Hormonen sowie durch Produktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Neuropeptiden (zur Übersicht [de Vellis, 1993](#)). Außerdem helfen Astrozyten zusammen mit Endothelzellen, die Blut-Hirn-Schranke und damit das innere Milieu des zentralen Nervensystems aufrecht zu erhalten.

Die Homöostase des zentralen Nervensystems (ZNS) und seine Antworten auf Erkrankung und Verletzung sind abhängig von den zellulären Interaktionen, die durch Ausschleusung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Proteasen und Proteaseinhibitoren reguliert werden. Verletzungen des Gehirns ziehen oft eine Aktivierung der umliegenden glialen Zellen nach sich, die auch als reaktive Gliose oder, je nach aktiviertem Zelltyp, als Astroglieose bzw. Mikroglieose bezeichnet wird. Dabei weisen Astrozyten eine hypertrophe Morphologie und eine verstärkte Immunreaktivität des für diesen Zelltyp spezifischen Intermediärfilamentes GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) auf ([Amaducci et al., 1981](#); [Aquino et al., 1988](#); [Balasingam et al., 1994](#)). Pathologische Prozesse wie die Gliose werden als ein für die Regeneration von Nervenfortsätzen schädigender Prozeß diskutiert. Es wird jedoch auch vermutet, daß zumindest in der Anfangsphase nach einer Verletzung die Gliose ein Reparaturversuch der glialen Zellen darstellt, da eine Vielfalt von neurotrophisch wirksamen Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixbestandteilen die Verletzungsstelle umgeben. Ein charakteristisches Beispiel für die reaktive Gliose sind chronisch neurodegenerative Erkrankungen, wie beispielsweise die Alzheimer-Krankheit, bei der aktivierte Astrozyten und Mikroglia immunhistochemisch dargestellt werden können ([Duffy et al., 1980](#); [Schechter et al., 1981](#); [Mancardi et al., 1983](#)).

1.1. Die Alzheimer-Krankheit

Im Jahre 1906 berichtete Alois Alzheimer zum ersten Mal über eine Erkrankung des Gehirns, die hauptsächlich Menschen höheren Alters betrifft und mit einem fortschreitenden Verlust der mentalen Fähigkeiten verbunden ist ([Alzheimer, 1906](#)). Die Alzheimer-Krankheit stellt eine ätiologisch heterogene Gruppe von klinisch und neuropathologisch sehr ähnlichen Krankheitsbildern dar. So werden präsenile, familiäre (autosomal dominante) Formen (*familial Alzheimer's disease*, FAD) von der Gruppe der senilen, sporadischen Erkrankungen (*Senile Demenz vom Alzheimer-Typ*, SDAT) unterschieden. Bei der sporadischen Form treten die ersten klinischen Symptome meist erst nach Erreichen des 65. Lebensjahres auf, während sich bei der familiären Form die Symptomatik häufig schon vor dem 50. Lebensjahr manifestiert, in einzelnen Fällen sogar schon vor dem 30. Lebensjahr ([Breitner & Folstein, 1980](#); [Nee et al., 1983](#); [Reisberg, 1983](#)).

Auf neuropathologischer Ebene führt die Alzheimer-Krankheit zu einem massiven Verlust von Neuronen im limbischen System und im cerebralen Cortex. Die damit verbundene Atrophie kann zu einem Gewichtsverlust des Gehirns von bis zu 60 % führen. Charakteristische Merkmale der Alzheimer-Krankheit sind intra- und extrazelluläre unlösliche, proteinhaltige Ablagerungen vor allem im Hippocampus, in der Großhirnrinde und im Hirnstamm ([Alzheimer, 1907](#); [Katzman, 1986](#); [Reisberg, 1983](#)). Die intrazellulären Ablagerungen in Perikarya, Axonen, Dendriten und Nervenendigungen treten in Form von neurofibrillären Bündeln (*neurofibrillary tangle*, NFT) auf und bestehen aus dem in pathologischer Weise veränderten Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau ([Goedert et al., 1991](#); [Trojanowski & Lee, 1994](#)). Die Neurofibrillenbündel sind kein Spezifikum der Alzheimer-Krankheit, sondern treten auch bei

anderen neurodegenerativen Erkrankungen auf. Die extrazellulären Ablagerungen bilden kugelförmige Läsionen mit einem Durchmesser von 10 bis 200 µm und werden durch deren Hauptkomponente auch als amyloidogene Ablagerungen, Amyloid-Plaques oder kurz als Plaques bezeichnet. Es werden in Abhängigkeit von der Aggregationsform und Fibrillenbildung des Amyloid-Proteins diffuse und senile Plaques unterschieden, wobei die diffusen Plaques die am frühesten erkennbaren strukturellen Veränderungen darstellen und auch bei älteren Menschen ohne Demenzercheinungen beobachtet werden können ([von Braunmühl, 1937](#)). Ein typischer seniler Plaque besteht aus einem stark verdichteten Kern des Amyloid-Proteins, umgeben von degenerierten und häufig angeschwollenen Nervenendigungen. Darüber hinaus findet sich bei einem Teil der Alzheimer-Patienten auch eine Ablagerung des Amyloid-Proteins in den cerebralen und meningealen Blutgefäßen in Form eines vaskulären Amyloids, die als kongophile Angiopathie bezeichnet wird ([Müller-Hill & Beyreuther, 1989](#)). Solche Amyloid-Ablagerungen konnten auch aus Gehirnen von älteren Patienten mit Down-Syndrom, mit HCHWA-D (*hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of Dutch type*) und mit Guam-Parkinson-Demenz isoliert werden ([Glenner & Wong, 1984](#); [Beyreuther et al., 1986](#); [Prelli et al., 1988](#); [van Duinen et al., 1987](#); [Guiryo et al., 1987](#)).

1.2. Das Amyloid und sein Vorläuferprotein APP

Da ein vermehrtes Vorkommen amyloidogener Ablagerungen in den für die intellektuellen Fähigkeiten entscheidenden Hirnregionen ein durchgängiges Merkmal der Alzheimer-Krankheit darstellt, und die Zahl dieser extrazellulären Ablagerungen mit dem Grad der Demenz korreliert ([Masters et al., 1985](#)), bestand ein großes Interesse an der Aufklärung der molekularen Struktur des Amyloid-Proteins und der Entstehung amyloidogener Ablagerungen, der Amyloidogenese. Die biochemische Analyse des Amyloid-Proteins führte 1984 zur Isolierung eines aus maximal 42 bis 43 Aminosäuren bestehenden Peptides als Hauptbestandteil der beschriebenen extrazellulären Ablagerungen ([Glenner & Wong, 1984](#); [Masters et al., 1985](#)). Aufgrund der Tendenz dieses Proteins, β -Faltblattstrukturen auszubilden ([Glenner & Wong, 1984](#); [Hilbich et al., 1991](#)) und durch die starken Aggregationseigenschaften wurde es mit einem Molekulargewicht von ca. 4 kDa als Amyloid β -Protein, A β -Protein oder auch kurz als A β bezeichnet.

Ausgehend von der A β -Proteinsequenz gelang es, cDNA-Klone aus Gehirn-Genbibliotheken zu identifizieren, die zeigten, daß die A β -Sequenz Teil eines wesentlich größeren Vorläuferproteins ist, dessen Gen auf dem langen Arm von Chromosom 21 lokalisiert ist ([Goldgaber et al., 1987](#); [Kang et al., 1987](#); [Robakis et al., 1987](#); [Tanzi et al., 1987](#)). Mittlerweile sind verschiedene cDNA's des mehr als 170 kb umfassenden APP-Gens (*amyloid precursor protein*, APP) beschrieben, die durch alternatives Spleißen von vier der insgesamt 19 Exons ([Kang et al., 1987](#); [Kitaguchi et al., 1988](#); [Ponte et al., 1988](#); [Tanzi et al., 1988](#); [Yoshikai et al., 1990](#)) entstehen. Die verschiedenen Isoformen der Amyloid-Vorläuferproteine werden nach der Anzahl der Aminosäuren (AS) benannt und besitzen eine Molmasse von ca. 100 bis 140 kDa. Die Abb. 1 zeigt eine schematische Domänenstruktur des Amyloid-Vorläuferproteins, dessen Primärstruktur charakteristische Merkmale eines Plasmamembran-ständigen Glykoproteins aufweist: Sie enthält einen großen extrazellulären Bereich, bestehend aus drei Domänen, gefolgt von einer Transmembranregion und einer kleinen zytoplasmatischen Domäne ([Kang et al., 1987](#); [Dyrks et al., 1988](#)). Diese enthält u.a. die NPXY-Konsensussequenz, wie sie für Clathrin-vermittelte Endozytose beschrieben wurde ([Chen et al., 1990](#)). Die A β -Sequenz (1-43) umfaßt 28 AS des extrazellulären Teils und 15 AS der Transmembranregion.

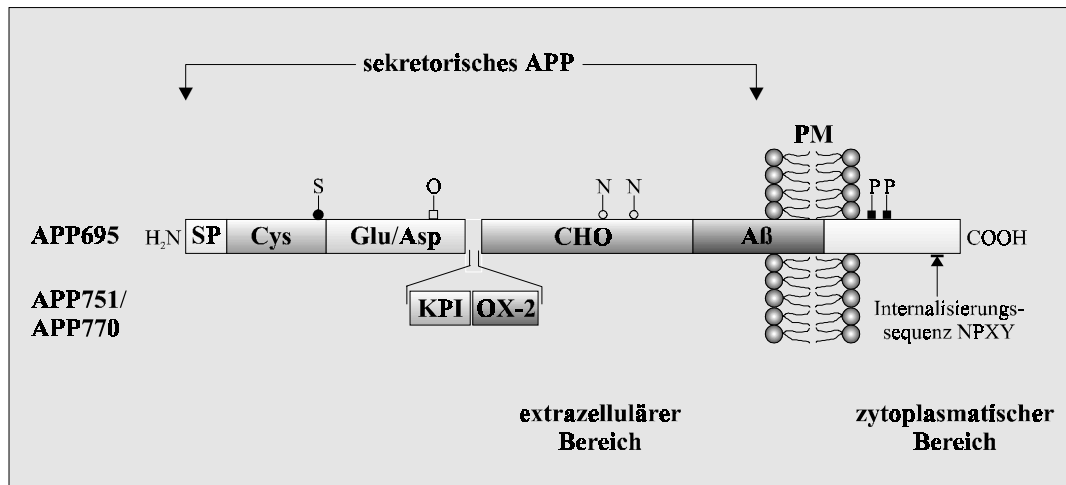


Abb. 1 : Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Amyloid-Vorläuferproteins

Am N-Terminus des APP ist das 17 AS große Signalpeptid (SP) lokalisiert, das die Translokation des Polypeptids in das endoplasmatische Retikulum vermittelt. Posttranslationale Modifizierungen sind O- und N-Glykosylierungen (O/N), Tyrosin-Sulfatisierung (S) und Phosphorylierung (P). Cys: Cystein-reiche Region. Glu/Asp: stark saure Domäne. KPI: Kunitz-Protease-Inhibitor-Domäne, die nur in den Isoformen APP751 und APP770 enthalten ist. OX-2: MRC-OX-2-Antigen-Domäne, die nur in APP770 enthalten ist. CHO: Kohlenhydrat-Domäne. Aβ: Amyloid β-Protein, PM: Plasmamembran.

Allen Translationsprodukten gemeinsam ist eine Vielzahl von posttranslationalen Modifizierungen, zu denen sowohl N- als auch O-Glykosylierungen, Phosphorylierungen, Tyrosin-Sulphatisierungen und proteolytische Spaltung zählen ([Oltersdorf et al., 1989](#); [Weidemann et al., 1989](#)). Durch proteolytische Spaltung wird ein großes, N-terminales APP-Fragment in das extrazelluläre Milieu sekretiert, das als sekretorisches APP bezeichnet wird.

Als häufigste Translationsprodukte im peripheren System wurden die Isoformen APP770 und APP751 mit einer Domäne beschrieben, deren Sequenz etwa 45% Homologie zu den Kunitz Typ II Serin-Protease-Inhibitoren (KPI) aufweist ([Kitaguchi et al., 1988](#); [Ponte et al., 1988](#); [Tanzi et al., 1988](#)). APP770 enthält zusätzlich eine Domäne, die Ähnlichkeiten mit dem MRC OX-2 Antigen auf Thymozyten aufweist ([Clark et al., 1985](#)). [Oltersdorf et al.](#) ([Oltersdorf et al., 1989](#)) und [van Nostrand et al.](#) ([van Nostrand et al., 1989](#)) zeigten, daß das sekretorische, KPI-haltige APP identisch mit einem schon vorher bekannten Serinproteasen-Inhibitor namens Protease-Nexin II ist. Die dominierende Isoform im Gehirn von Mensch und Ratte ist APP695 ohne die Domänen KPI und OX-2 und wird vorwiegend von Neuronen exprimiert ([Golde et al., 1990](#); [Kang et al., 1987](#); [Kang & Müller-Hill, 1990](#); [Neve et al., 1988](#); [Tanzi et al., 1987](#)). Die Isoformen APP751 und APP770, die die KPI-Domäne aufweisen, werden vorwiegend von glialen Zellen exprimiert ([Gray & Patel, 1993a](#), [Gray & Patel, 1993b](#)).

Ein weiteres alternativ gespleißtes APP-Transkript (ohne Exon 15) wurde als erstes in peripheren Leukozyten und Mikroglia nachgewiesen und daher als Leukozyten-abgeleitetes APP oder auch L-APP bezeichnet ([Banati et al., 1993](#); [König et al., 1992](#)). Homologe APP-Formen wurden sowohl in Säugetieren mit APLP-1 (amyloid precursor like protein 1) ([Wasco et al., 1992](#)) und APLP-2 ([Wasco et al., 1993](#)) als auch in *Drosophila melanogaster* (APPL) ([Rosen et al., 1989](#)) und im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (APL-1) ([Daigle & Li, 1993](#)) gefunden. Im Gegensatz zu APP besitzen alle APP-ähnlichen Proteine keine Aβ-Region ([Sandbrink et al., 1994](#)).

Eine für die Alzheimer-Krankheit wesentliche posttranslationale Modifizierung ist die proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins. Es werden zwei Prozessierungswege unterschieden: Den amyloidogenen Weg, bei dem das A β -Protein freigesetzt werden kann und den nicht-amyloidogenen Weg, bei dem die Entstehung des A β -Proteins durch einen proteolytischen Schnitt in der A β -Region verhindert wird. Die APP-Prozessierung zu den verschiedenen Spaltprodukten erfolgt durch unterschiedliche, bisher noch nicht identifizierte Sekretasen, die als α -, β - und γ -Sekretaseaktivität bezeichnet werden (siehe Abb. 2).

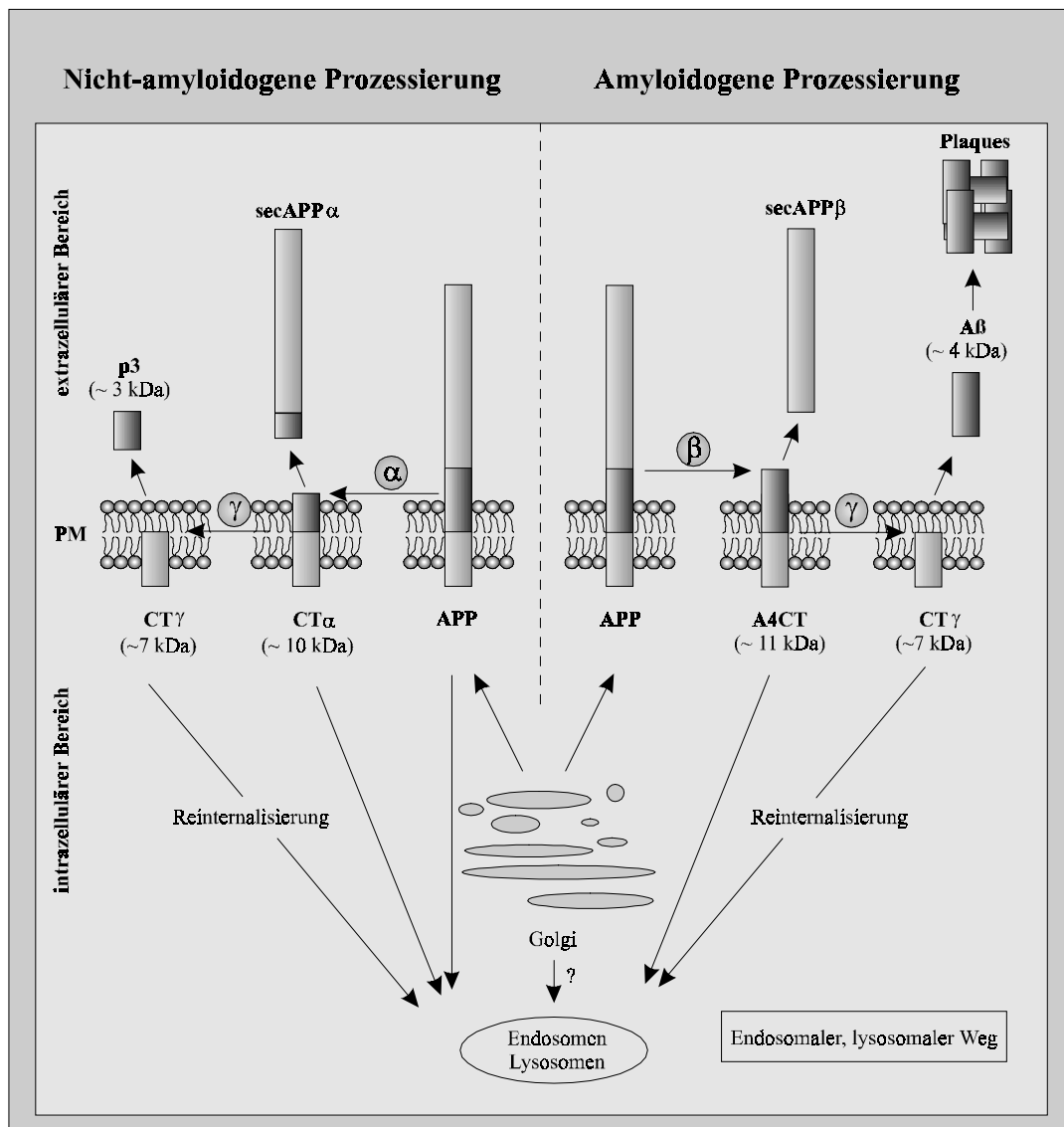


Abb. 2 : Schematische Darstellung der APP-Prozessierungswege

Die nicht-amyloidogene Prozessierung beginnt mit der α -Sekretase (α), die in der A β -Region (dunkler Kasten) schneidet, so daß kein A β freigesetzt werden kann. Der amyloidogene Weg wird durch die Aktivität der β -Sekretase (β) eingeleitet, die N-terminal der A β -Region schneidet. Die γ -Sekretase (γ) spaltet dann die bei beiden Prozessierungswegen entstehenden C-terminalen Fragmente CT α bzw. A4CT, so daß bei dem nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg das p3-Fragment und bei der amyloidogenen Prozessierung A β -Protein sekretiert wird.

Für den nicht-amyloidogenen Weg wird vermutet, daß eine sogenannte α -Sekretase APP an der Position Lys16/Leu17 innerhalb der A β -Sequenz schneidet ([Weidemann et al., 1989](#), [Esch et al., 1990](#), [Sisodia et al., 1990](#)), wodurch ein großes N-terminales Spaltprodukt (secAPP α) und ein membranständiges C-terminales Fragment (CT) entstehen ([Oltersdorf et al., 1990](#)). Das C-terminale Fragment kann durch Aktivität der γ -Sekretase weiter prozessiert werden, woraus die Sekretion eines 3 kDa großen Fragmentes, der C-terminale Teil der A β -Sequenz (AS 17-40/42, p3), resultiert ([Haass et al., 1993](#)), oder das gesamte CT-Fragment wird über das NPXY-Motiv internalisiert und in den Lysosomen abgebaut.

Im amyloidogenen Prozessierungsweg entsteht vermutlich durch Aktivität der β -Sekretase, die an Position AS1 der A β -Sequenz schneidet, zunächst das membran-ständige A4CT-Fragment mit der gesamten A β -Sequenz ([Golde et al., 1992](#)) und das große N-terminale Spaltprodukt secAPP β . Die enzymatische Aktivität der γ -Sekretase führt dann zur Freisetzung des vollständigen A β -Proteins (1-40/42) in den extrazellulär-en Raum ([Haass & Selkoe, 1993b](#)). Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, daß ein Teil des APP unter Bildung amyloidogener C-terminaler Fragmente über einen endosomalen/lysosomalen Weg prozessiert wird ([Estus et al., 1992](#), [Golde et al., 1992](#); [Haass et al., 1992](#)).

Wie in der Abb. 3 (siehe 1.3.) angedeutet, wurden im Hinblick auf den C-Terminus unterschiedlich lange proteolytische Spaltprodukte des A β -Proteins nachgewiesen ([Zhong et al., 1994](#)). Es wird vermutet, daß die C-terminale Heterogenität des A β -Proteins eine Folge unterschiedlicher γ -Proteaseaktivitäten ist ([Citron et al., 1996](#)). Unter physiologischen Bedingungen wird jedoch vorwiegend A β (1-40) gebildet ([Haass et al., 1992](#); [Seubert et al., 1992](#); [Dyrks et al., 1993](#)). Neben verschiedenen γ -Sekretaseschnittstellen wurden auch für die α - und β -Sekretaseaktivität unterschiedlich lange Spaltprodukte beschrieben. Aus diesem Grund werden die einzelnen Sekretasen auch häufig als Sekretaseaktivitäten bezeichnet, da so die Möglichkeit miteinbezogen wird, daß es sich um mehrere Proteasen handeln könnte.

Der zelluläre Ursprung des A β -Proteins ist noch nicht endgültig geklärt. Viele Autoren sind überzeugt, daß Neurone die Hauptproduzenten des A β -Proteins sind ([Palmert et al., 1989](#); [Golde et al., 1992](#); [Haass et al., 1992](#); [Shoji et al., 1992](#)). Die Befunde von Le Blanc *et al.* ([Le Blanc et al., 1997](#)) und Busciglio *et al.* ([Busciglio et al., 1993](#)) deuten jedoch darauf hin, daß neben den Neuronen auch Astrozyten in der Lage sind, amyloidogene Spaltprodukte wie das A β -Protein zu bilden. Ein wesentlicher Schwerpunkt in der Alzheimer-Forschung ist die Aufklärung der Amyloidogenese. Es stellt sich die Frage, warum es zu einer verstärkten A β -Freisetzung in der Alzheimer-Pathogenese kommt und welche Zellen darin involviert sind. Die Anwesenheit aktivierter Astrozyten und zahlreicher immunmodulatorischer Moleküle (siehe 1.4.) scheinen hierbei immer mehr an Bedeutung zu gewinnen. Einen Hinweis für eine veränderte APP-Expression in aktivierten Astrozyten lieferten Untersuchungen an Tier- und Zellkulturmodellen verschiedener Arbeitsgruppen, die zeigten, daß aktivierte Astrozyten ihre APP-Expression verstärken ([Siman et al., 1989](#); [Gray & Patel, 1993a](#), [Gray & Patel, 1993b](#)). Inwieweit aktivierte Astrozyten ihre amyloidogene APP-Prozessierung verändern, wurde bisher noch nicht untersucht.

1.3. Genetische Ursachen der Alzheimer-Krankheit

Die Ätiologie der Alzheimer-Krankheit ist zum Teil genetisch bedingt und wird daher auch als familiäre Alzheimer-Demenz (FAD) bezeichnet. Es konnten bislang neben dem APP-Gen auf Chromosom 21 drei weitere Gene identifiziert werden (siehe Tab. 1), die zur Ausbildung der Alzheimer-Pathogenese beitragen. Dabei handelt es sich um das Gen für Apolipoprotein (ApoE) auf Chromosom 19, Presinilin 1 (PS1) auf Chromosom 14 und Presinilin 2 (PS2) auf Chromosom 1. Insgesamt sind diese vier Gene an ca. 50 % aller FAD-Fälle beteiligt ([Tanzi et al., 1996](#)).

Tab. 1 : Genetische Ursachen der Alzheimer-Krankheit und deren Einfluß auf die Entstehung des A β -Proteins

Chromosom	Gendefekt	Alter bei Diagnose	Anteil an AD-Fällen insgesamt	A β -Phänotyp
21	APP-Mutationen : Swedish Dutch/Flemish London	50 Jahre	< 0,5 %	erhöhte Produktion : A β (1-40) und A β (1-42) A β (1-42) A β (1-42)
19	ApoE- ϵ 4-Polymorphismus	> 60 Jahre	30 – 50 %	Dichte der Plaques und vaskuläre Ablagerungen
14	Presinilin 1-Mutationen	40-50 Jahre	2 - 5 %	erhöhte Produktion des A β (1-42)
1	Presinilin 2-Mutationen	50 Jahre	< 0,5 %	erhöhte Produktion von A β (1-42)

Bisher konnten sechs verschiedene Mutationen im APP-Gen identifiziert werden, die alle in der Nähe oder innerhalb der A β -Region lokalisiert sind und zu einer erhöhten Sekretion des A β (1-40) und A β (1-42) führen ([Mullan et al., 1992](#); [Murell et al., 1991](#); [Chartier-Harlin et al., 1991](#); [Levy et al., 1990](#)). In Abb. 3 sind die im APP-Gen vorkommenden Mutationen wie z.B. die „schwedische Mutation“ (*swedish mutation*) mit einer Doppelmutation im Kodon 670/671 (APP770) direkt N-terminal der A β -Region ([Mullan et al., 1992](#)) dargestellt. Diese Mutation führt in Zellkulturexperimenten zu einer fünf- bis achtfach erhöhten Freisetzung des gesamten A β in das konditionierte Medium im Vergleich zu Wildtyp APP-exprimierenden Zellen, wobei hauptsächlich A β (1-40) verstärkt sekretiert wird ([Citron et al., 1992](#)). Die flämische Mutation (*flemish mutation*) im APP-Gen bei Kodon 692 führt neben den klassischen Merkmalen der Alzheimer-Krankheit zu einer Amyloidose durch zusätzliche Ablagerungen von A β in cerebralen Blutgefäßen, die auch als kongophile Amyloid-Angiopathie bezeichnet wird ([Hendriks et al., 1992](#)). Ebenso tritt bei der holländischen Mutation (*dutch mutation*) im Kodon 693 neben den typischen Merkmalen der Alzheimer-Krankheit zusätzlich die cerebrale Hämorrhagie mit Amyloidose-Dutch-Typ (HCHWA-D) auf. Beide Mutationen sind mit einer verstärkten Entstehung des A β (1-42) assoziiert, das auf eine verstärkte Aktivität der γ -Sekretase hinweist. Eine weitere Mutation, die London-Mutation, ist im Bereich der γ -Sekretase-Schnittstelle lokalisiert. Die Aminosäure Valin in Position 717 (APP770) ist gegen Isoleucin, Phenylalanin oder Glycin ausgetauscht ([Goate et al., 1991](#); [Murell et al., 1991](#); [Yoshioka et al., 1991](#); [Chartier-Harlin et al., 1991](#); [Farlow et al., 1994](#)). Auch durch diese Mutation wird in Zellkulturexperimenten die Sekretion des A β (1-42) verstärkt ([Cai et al., 1993](#); [Suzuki et al., 1994](#); [Tamaoka et al., 1994](#)). Alle Mutationen im APP-Gen führen in Zellkulturmodellen zu einer verstärkten Expression des amyloidogenen C-terminalen Fragments A4CT.

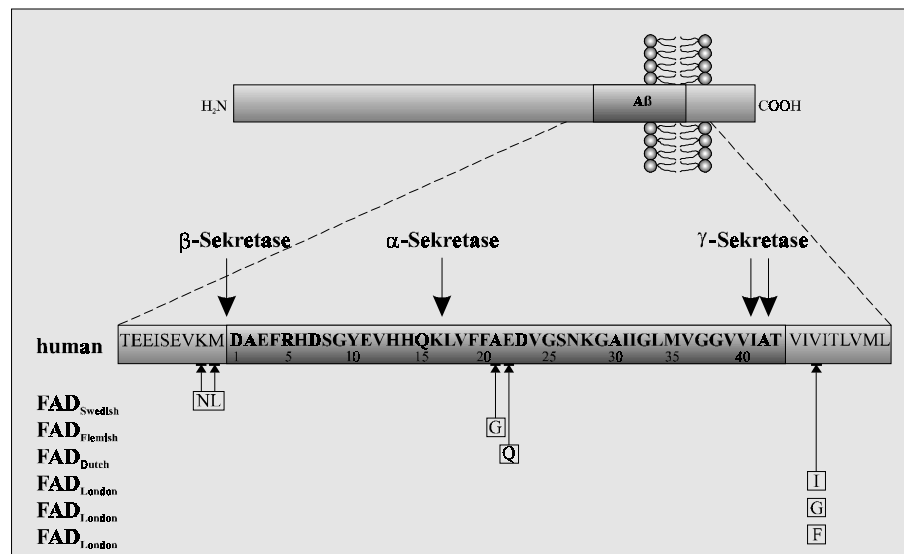


Abb. 3 : Darstellung der A β -Region mit den verschiedenen Mutationen im APP-Gen, die zu familiärer Alzheimer-Krankheit bzw. bei der Flemish-/Dutch-Mutation zusätzlich zu der HCWA-D führen. Auf molekularer Ebene haben diese die verstärkte Bildung von A β (1-40) bzw. A β (1-42) zur Folge. Die Schnittstellen der Sekretaseaktivitäten sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Neben den Mutationen im APP-Gen konnten zahlreiche Missense-Mutationen in den Genen für Presenilin 1 und 2 (PS1 bzw. PS2) identifiziert werden, wodurch es zu einem frühen Ausbruch der Alzheimer-Krankheit (early-onset) in der fünften bis sechsten Lebensdekade kommt ([Sherrington et al., 1995](#); [Levy-Lahad et al., 1995](#)). In Zellkulturmodellen konnte ein Einfluß von Mutationen im Presenilin-Gen auf die Prozessierung des APP und die Entstehung des A β -Proteins gezeigt werden ([Borchelt et al., 1996](#); [Scheuner et al., 1996](#); [Citron et al., 1997](#); [Haass, 1997](#)).

Als ein weiteres Risikogen wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen ApoE-ε4 auf Chromosom 19 beschrieben ([Corder et al., 1993](#); [Strittmatter et al., 1993](#); [Saunders et al., 1993](#)). ApoE ist Bestandteil der „*low density*“-Lipoproteine (LDL) und vermittelt die Bindung von LDL an den LDL-Rezeptor. Es existieren drei verschiedene Allele des ApoE-Gens, die als ε2, ε3 und ε4 bezeichnet werden ([Weisgraber, 1994](#)). Im ZNS ist ApoE an der Regeneration und Degeneration neuronaler Zellen beteiligt, indem es die Neuverteilung von Lipiden, Lipid-Abbauprodukten und Cholesterin ermöglicht. Im Gehirn wird ApoE hauptsächlich nach cerebraler Schädigung von Astrozyten produziert.

1.4. Pathophysiologische Prozesse der Alzheimer-Krankheit

Neben den genetischen Faktoren der Alzheimer-Krankheit, die die Ursache vieler familiärer Fälle sind, spielen pathophysiologische Prozesse eine wesentliche Rolle im Auftreten der sporadischen Alzheimer-Form. Im Jahre 1975 wurde erstmals vermutet, daß inflammatorische Prozesse in der Alzheimer-Pathogenese involviert sind ([Ishii et al., 1975](#)). Erst in den letzten Jahren konnte durch den Nachweis zahlreicher Proteine, die an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, und durch die Anwesenheit aktivierter Astrozyten und Mikroglia in der Nähe amyloidogener Ablagerungen die Vermutung verstärkt werden, daß eine chronische Neuroinflammation in der Alzheimer-Krankheit existiert (zur Übersicht [McGeer & McGeer, 1995](#); [Rogers et al., 1996](#)). Immunhistochemische Studien zeigen, daß eine Vielfalt an Zytokinen,

Wachstumsfaktoren, Komplement-Proteinen, Akute-Phasen-Proteinen und Adhäsionsmolekülen mit diffusen und senilen Plaques im Hirn von Alzheimer-Patienten assoziiert sind (siehe Tab. 2).

Tab. 2 : Charakteristische Marker inflammatorischer Prozesse im Hirn von Alzheimer-Patienten

MHC I (McGeer et al., 1989)	Proteine aus dem klassischen Komplementsystem
	Clq (Eikelenboom & Stam, 1984)
MHC II	C4 (Eikelenboom & Stam, 1984)
HLA-DR (Luber-Narod & Rogers, 1988)	C4a (McGeer et al., 1989)
HLA-DP (Luber-Narod & Rogers, 1988)	C3 (Eikelenboom & Stam, 1984)
HLA-DQ (Luber-Narod & Rogers, 1988)	C3b (Eikelenboom & Stam, 1984)
	C3c (Eikelenboom & Stam, 1984)
Zytokine	C3d (Eikelenboom & Stam, 1984)
IL-1 α (Griffin et al., 1989)	C7 (McGeer et al., 1989)
IL-1 β (Wood et al., 1993)	C9 (McGeer et al., 1989)
IL-6 (Bauer et al., 1991)	C5b-9 (MAC) (McGeer et al., 1989)
TNF (Fillit et al., 1991)	
	mRNA's aus dem klassischen Komplementsystem
Zytokinrezeptoren	C1q (Walker & McGeer, 1992)
IL-2R (Itagaki et al., 1989)	C4 (Walker & McGeer, 1992)
IFN-R α (Yamada & Yamanaka, 1995)	C3 (Walker & McGeer, 1992)
Leucocyte Common Antigen	Komplement-Verteidigungsproteine
CD45 (Rozemuller et al., 1989)	MIRL (McGeer et al., 1991)
	Clusterin (Choi-Miura et al., 1992)
Leukozyten Adhäsionsmoleküle	Vitronectin (Akiyama et al., 1991)
ICAM-1 (Akiyama et al., 1993)	C4BP (Kalaria & Kroon, 1992)
LFA-1 (Rozemuller et al., 1989)	C1-INH (Eikelenboom et al., 1989)
Fc Rezeptoren	Komplementrezeptoren
FC γ R 1 (McGeer et al., 1989)	CR3 (Akiyama et al., 1990)
	CR4 (Akiyama et al., 1990)
Akute Phasen Proteine	Wachstumsfaktoren
α -1-Antichymotrypsin (Abraham et al., 1988)	bFGF (Stopa et al., 1990)
α -2-Makroglobulin (Bauer et al., 1991)	TGF β -1 (Chao et al., 1994)
Serum Amyloid P (Coria et al., 1988)	Midkine (Yasuhara et al., 1993)
α -1-Antitrypsin (Gollin et al., 1992)	
C-reaktives Protein (Iwamoto et al., 1994)	

Die immunmodulatorischen Moleküle im Hirn von Alzheimer-Patienten entsprechen dem molekularen Profil aktivierter Astrozyten und Mikroglia innerhalb einer reaktiven Gliose. Astrozyten in der Nähe amyloidogener Ablagerungen zeigen eine fünf- bis zehnfach verstärkte GFAP-Expression.

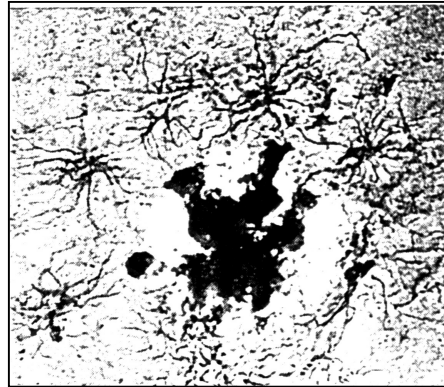


Abb. 4 : Immunhistochemische Dreifachfärbung eines senilen Plaques eines humanen post-mortem Alzheimer-Gewebes, bei dem das Amyloid β -Protein ($A\beta$) als helle globuläre Masse (ThioflavinS-Färbung) und schwarz-gefärbte Mikroglia (HLA-DR-Färbung) sichtbar sind. Umgeben wird der Plaque von sternförmigen aktivierten Astrozyten (GFAP-Färbung) ([McGeer & McGeer, 1995](#)).

Die Anordnung aktivierter Astrozyten und Mikroglia um den senilen Plaque (siehe Abb. 4) läßt vermuten, daß diese Zellen möglicherweise durch das $A\beta$ -Protein selbst aktiviert werden. Tatsächlich konnte ein direkter Einfluß des $A\beta$ -Proteins auf Astrozyten und Mikroglia nachgewiesen werden. In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, daß Mikroglia, die mit $A\beta$ -Protein und $IFN\gamma$ (*Interferon- γ*) behandelt wurden, die neurotoxischen Faktoren $TNF\alpha$ (*Tumor necrosis factor α*) und NO sekretieren ([Meda et al., 1995](#)). Astrozyten, die mit $A\beta$ -Protein behandelt wurden, sekretieren verstärkt Zytokine und Wachstumsfaktoren ([Araujo & Cotman, 1992](#); [Gitter et al., 1995](#)).

Wie Zellkultur- und Tiermodellen belegen, exprimieren Astrozyten im aktivierten Zustand eine Vielfalt an Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Matrixproteinen und Adhäsionsmolekülen (zur Übersicht [Eddleston & Mucke, 1993](#)). So wurde beispielsweise mittels eines Tiermodells gezeigt, daß die intracerebrale Injektion von IL1 (*Interleukin-1*) die Astroglieose auslöst ([Giulian et al., 1988](#)). Durch Zellkulturexperimente wurde gezeigt, daß IL1-behandelte Astrozyten verstärkt $TNF\alpha$, IL6 (*Interleukin-6*) und TGF β (*Transforming growth factor β*) sekretieren ([Chung & Benveniste, 1990](#); [da Cunha & Vitkovic, 1992](#)). Neben der verstärkten Zytokin-Sekretion fanden Ballestas und Benveniste ([Ballestas & Benveniste, 1995](#)), daß primäre Astrozyten, die mit den Zytokinen IL1 β und $TNF\alpha$ behandelt wurden, verstärkt Adhäsionsmoleküle wie z.B. ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) exprimieren. Aus immunhistochemischen Untersuchungen geht hervor, daß ICAM-1 mit amyloidogenen Ablagerungen und aktivierten Astrozyten im Hirn von Alzheimer-Patienten assoziiert ist ([Akiyama et al., 1993](#); [Eikelenboom et al., 1994](#); [Verbeek et al., 1994](#)). Welche Rolle Adhäsionsmoleküle in der Alzheimer-Pathogenese spielen, wurde bisher jedoch noch nicht untersucht. Interessanterweise sind Mikroglia in der Nähe amyloidogener Ablagerungen immunreaktiv für den Liganden des ICAM-1, das β 2-Integrin LFA-1 (CD11a, *leukocyte function-associated antigen*).

Die Anwesenheit all dieser immunmodulatorischen Marker belegen die Existenz einer Hirn-spezifischen Inflammation, die zu einer Dysregulation der Hirnhomöostase führen kann. Interessanterweise ist eine chronische Neuroinflammation immer mit dem Auftreten einer

Neurodegeneration assoziiert. Dies läßt die Vermutung zu, daß eine chronische Neuroinflammation an der Ausprägung einer Neurodegeneration ursächlich beteiligt ist.

Neben den klassischen Merkmalen der Neuroinflammation weisen erste Tiermodelle auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Neuroinflammation und Amyloidogenese hin. In den letzten Jahren wurde mit großem Aufwand an der Etablierung transgener Tiermodelle gearbeitet, die Teilaspekte der Alzheimer-Pathogenese reflektieren sollen. Zur Zeit existieren unterschiedliche transgene Mauslinien, die aufgrund verstärkter Expression der APP-cDNA mit FAD-Mutationen die für die Alzheimer-Krankheit spezifische Plaque-Bildung zeigen ([Games et al., 1995](#); [Hsiao et al., 1996](#), [Sturchler-Pierrat et al., 1997](#)). Allerdings konnte in diesen Mäusen keine signifikante Neurodegeneration beobachtet werden. In allen älteren Tieren tritt neben den amyloidogenen Ablagerungen eine starke Astro- und Mikrogliose auf. Es bleibt abzuwarten, inwieweit Neurodegeneration eine Folgereaktion der starken Gliose ist.

1.5. Zielsetzung

Neben einer reaktiven Astro- und Mikrogliose weisen zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren, die in der Nähe amyloidogener Ablagerungen im Hirn des Alzheimer-Patienten auftreten, auf eine Alzheimer-assoziierte Neuroinflammation hin, die an der Ausprägung der Neurodegeneration ursächlich beteiligt sein kann. Astrozyten sind in der Lage, im aktivierten Zustand eine Vielfalt immunmodulatorischer Moleküle zu exprimieren, die an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. Es stellt sich zum einen die Frage, warum Astrozyten in der Alzheimer-Pathogenese aktiviert werden, und zum anderen, welche pathophysiologische Bedeutung aktivierte Astrozyten für die Alzheimer-Krankheit besitzen. Aus immunhistochemischen Daten geht hervor, daß aktivierte Astrozyten um amyloidogene Ablagerungen verstärkt das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 exprimieren ([Akiyama et al., 1993](#)). Somit stellt ICAM-1 ein Marker für die astrozytäre Aktivität dar, die mit der Alzheimer-Pathogenese assoziiert ist. Untersuchungen zur Expression des ICAM-1 in Astrozyten waren Ausgangspunkt der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente. Es sollte überprüft werden, ob die astrozytäre ICAM-1-Expression direkt durch die amyloidogenen Ablagerungen verursacht oder verstärkt werden kann oder eine Folgereaktion der mikroglialen Aktivierung ist. Anschließend wurde der Signaltransduktionsweg, der zur Astrozyten-Aktivierung führt, näher charakterisiert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung aktivierter Astrozyten im Zusammenhang mit der Alzheimer-assoziierten Amyloidogenese. Bisher standen Neurone als Hauptproduzenten des Amyloid β -Proteins im Vordergrund der Alzheimer-Forschung. Da jedoch verschiedene Veröffentlichungen darauf hinweisen, daß Astrozyten ebenfalls in der Lage sind, eine direkte Rolle in der Entstehung der amyloidogenen Ablagerungen zu spielen ([Le Blanc et al., 1997](#); [Busciglio et al., 1993](#)), wurde die amyloidogene APP-Prozessierung aktivierter Astrozyten untersucht.

Abschließend sollte die pathophysiologische Bedeutung der Astrozyten in der Alzheimer-Pathogenese im Zusammenhang mit den erzielten Ergebnissen diskutiert werden.

2. Material

2.1. Chemikalien und Reagenzien

<i>Agfa Gaevert</i> (Leverkusen) :	Entwickler G153; Fixierer G153
<i>Boehringer</i> (Mannheim) :	ABTS; Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (Complete)
<i>Life Technologies</i> (Gibco BRL), (Eggenstein) :	Agarose; Lipofektin
<i>Merck</i> (Darmstadt) :	APS; EDTA; Essigsäure; Ethanol; Glycerol (87%); Methanol; NaCl; Tris
<i>NEN Du Pont</i> (Bad Homburg) :	L-[³⁵ S]-Methionin, < 1000 Ci/mMol; Röntgenfilme Reflection NEF-496
<i>Packard</i> :	Ultima Gold Szintillationsflüssigkeit
<i>Riedel de Haehn</i> (Seelze) :	Diethanolamin; Gelatine
<i>Roth</i> :	BCIP; NBT; Rotiphoese Gel 30; TEMED
<i>Serva</i> (Heidelberg) :	Acrylamid; BSA, Fraktion V, pH 7,0; N, N, Methylenbisacrylamid
<i>Sigma</i> (Deisenhofen) :	Ampicillin; β -Mercaptoethanol; Bicin; Bistris; Ethidiumbromid; Glutaraldehyd; L-Homoarginin; NP-40; p-Nitrophenolphosphat; Paraformaldehyd; Protein-A-Sepharose; SDS; Triton X-100; Tween20

2.2. Reagenzien für die Zellkultur

<i>Biomol</i> (Hamburg) :	K-252a; Herbimycin A; Wortmannin
<i>Calbiochem</i> (Bad Soden) :	Bisindolylmaleimid; H-89, Dihydrochlorid; KT5823; KT5926
<i>Boehringer</i> (Mannheim) :	- TGF β 1 (human, rekomb.), wirksam in Maus-, Ratten- und Human-Zellen - IL1 β (Maus, rekomb.), wirksam in Maus- und Human-Zellen - IL6 (human, rekomb.), wirksam in Maus- und Human-Zellen - bFGF (Rind, rekomb.), wirksam in Maus-, Ratten-, Human-, Kaninchen- und Rinder-Zellen - IFN γ (human, rekomb.), wirksam in Human-Zellen
<i>Life Technologies</i> :	IFN γ (Ratte, rekomb.), wirksam in Maus- und Ratten-Zellen
<i>Promega</i> (Madison) :	TNF α (human, rekomb.), wirksam in Maus- und Human-Zellen
<i>Schering AG</i> (Berlin) :	Rolipram, PGD2-Analoga
<i>Sigma</i> (Deisenhofen) :	Forskolin; PGE1; PGE2; PGF2 α

2.3. Enzyme und Antikörper

Amersham : Schaf-anti-Maus Ig-POD, Schaf-anti-Kaninchen Ig-POD

Boehringer (Mannheim) : DNase I, Restriktionsendonukleasen,
monoklonaler Antikörper anti-human-ICAM-1

Camon Labor Service GmbH (Wiesbaden) :

Vectastain ABC Elite Kit, enthält sekundären, Biotin-gekoppelten Antikörper anti-Maus-IgG-Biotin und Peroxidase-gekoppeltes Avidin

Eurogentec (Seraing): Präimmunserum aus Kaninchen

PharMingen (San Diego) : MAk anti-Ratten-ICAM-1
MAk anti-GFAP (aus den Zellklonen 4A11, 1B4, 2E1)

Promega (Madison): Ziege-anti-Maus-IgG-AP; Ziege-anti-Kaninchen-IgG-AP

Serotec : anti-APP/CT (AHP338), gegen die C-terminale Sequenz NQMQUEFFKYTPNEYG des APP gerichtet

Sigma (Deisenhofen) : Kaninchen-anti-Maus-IgG, polyklonales Kaninchenserum; polyklonales Kaninchenserum anti-Aktin; MAk anti-NF68; MAk anti-Synaptophysin (Klon SVP-38)

Außerdem wurden folgende Antikörper der *AG Beyreuther* (ZMBH, Heidelberg) verwendet :

MAk 22C11 : monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen das *E. coli*-Fusionsprotein FdAPP695 ([Weidemann et al., 1989](#)); das Epitop liegt im N-terminalen Bereich von APP ([Hilbich et al., 1993](#))

anti-FdAPP : polyklonales Kaninchenserum gegen das bakterielle *E.coli*-Fusionsprotein FdAPP695 ([Weidemann et al., 1989](#))

anti-A4CT : polyklonales Kaninchenserum gegen A4CT ([Dyrks et al., 1993](#))

anti-CT : polyklonales Kaninchenserum gegen die zytoplasmatische Domäne des APP770, Reste 728-770 ([Mönning et al., 1995](#))

anti-A β (2-43): polyklonales Kaninchenserum gegen die A β -Sequenz, Reste 2-43

Schering AG Berlin (Dr. U. Mönning) :

anti-A β (1-6) : monoklonaler Antikörper (Klon 8A6) gegen die N-terminale A β -Sequenz, Reste 1-6; erkennt A β (1-40) und (1-42) sowie sekretorisches APP nach α -Sekretase-aktivität

anti-A β (1-40) : monoklonaler Antikörper (Klon 13E9) gegen den C-Terminus von A β , der spezifisch A β (1-40) sowie p3 erkennt

anti-A β (1-42) : monoklonaler Antikörper (Klon 6D5) gegen den C-Terminus von A β , der spezifisch A β (1-42) sowie p3 erkennt

2.4. Molmassenstandards

Life Technologies (Gibco BRL), (Eggenstein) :

Für niedrige Molmassen (2,3 bis 43 kDa), vorgefärbte Proteinmischung

Für hohe Molmassen (26,6 bis 180 kDa), vorgefärbte Proteinmischung

Novex (San Diego) : MultiMark Multi-Colored-Standard (3 bis 185 kDa), vorgefärbte Proteinmischung

Sigma (Deisenhofen) : Für hohe Molmassen (35 bis 190 kDa), vorgefärbte Proteinmischung

Amersham International : Für niedrige Molmassen (3 bis 43 kDa), [¹⁴C]-methylierte Proteine

Für hohe Molmassen (14,3 bis 200 kDa), [¹⁴C]-methylierte Proteine

2.5. Zellkulturmedien und Zusätze

Biochrom (Berlin) : Fötale Kälberserum (FCS, Fetal Calf Serum) (Charge 691H, hitzeinaktiviert)

Pferdeserum (Charge 725H, hitzeinaktiviert)

Life Technologies (Gibco BRL), (Eggenstein) :

- BME-Medium (ohne L-Glutamin)

- DMEM-Medium (mit L-Glutamin, 4500 mg Glukose/l, ohne Natriumpyruvat)

- Einfriermedium mit Glycerol

- HBSS-Lösung (mit Ca²⁺, Mg²⁺, ohne Phenolrot)

- HBSS-Lösung (ohne Ca²⁺, Mg²⁺, mit Phenolrot)

- Hygromycin B-Lösung (50 mg Hygromycin B/ml)

- L-Glutamin-Lösung (200 mM)

- MEM-Medium (ohne L-Glutamin, ohne Methionin)

- MEM-Medium (1000 mg Glukose/l, 292 mg L-Glutamin/l)

- nicht essentielle Aminosäure-Lösung, 100fache Stammlösung (ohne L-Glutamin)

- Nutrient Mixture Ham's F12-Medium (1802 mg Glukose/l, 146 mg L-Glutamin/l, 110 mg Na-Pyruvat/l)

- Opti-Mem-1-Medium (mit L-Glutamin, 2,4 g Natriumbicarbonat/l)

- PBS (Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 0,2 g KCl/l, 0,2 g KH₂PO₄/l, 8 g NaCl/l, 1,15 g Na₂HPO₄/l; ohne Ca²⁺, Mg²⁺, Natriumbicarbonat)

- Penicillin-/Streptomycin-Lösung (10000 U Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml)

- Trypsin-Lösung (0,25 % w/v in 0,4 g KCl/l, 2,2 g NaHCO₃/l, 6,8 g NaCl/l, 1 g Glukose/l, 0,005 g Phenolrot/l)

- Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g Trypsin/l, 0,2 g EDTA/l in modifizierter Puck's Salzlösung)

Sigma (Deisenhofen) : Poly-L-Lysin, Hydrobromid (Molmassen 70000 – 150000)

Cytosin-β-D-Arabinofuranosid, Hydrochlorid

2.6. Bakterienmedien

LB-Medium : 10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, ad 1000 ml Bidest

LB-Amp-Medium : 100 µg Ampicillin/ml in LB-Medium

LB-Amp-Agar : 1,5 % w/v Agar in LB-Medium aufkochen, und nach Abkühlen der Agar-Lösung auf ca. 40°C werden 100 µg/ml Ampicillin hinzugegeben.

2.7. Bakterienstämme

E.coli DH5α : F⁻, endA1, hsdR17 (rk⁻, mk⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, s80dlacZ M15 ([Hanahan, 1985](#)); von der Firma Life Technologies bezogen

2.8. Zelllinien

SH-Sy5y : humane Neuroblastom-Zelllinie Sy5y (Schering AG Berlin)

Sy5y/SPA4CT : stabil transfizierte SH-Sy5y mit dem Konstrukt pCEP4/SPA4CT ([Dyrks et al., 1988](#))

Sy5y/751 : stabil transfizierte SH-Sy5y mit dem Konstrukt pCEP4/APP751 ([Urmoneit, 1996](#))

Sy5y/751sw : stabil transfizierte SH-Sy5y mit dem Konstrukt pCEP4/APP751sw ([Urmoneit, 1996](#))

CCF-STTG1 : humane Astrozytom-Zelllinie (ATCC, Rockville Maryland)

H4 : humane Neurogliom-Zelllinie (ATCC, Rockville Maryland)

2.9. Tiere

Wistar-Ratten, Tierzucht der Schering AG

2.10. Plasmide

pCEP4: Episomal replizierender Expressionsvektor der Firma Invitrogen (Leek) mit einem starken, ubiquitär exprimierenden Cytomegalovirus-Promotor (CMV) und einem Hygromycin B-Selektionsmarker für eukaryotische Zellen.

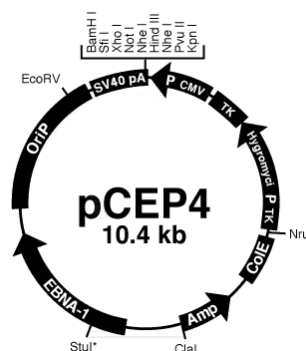


Abb. 5 : Struktur des Vektors pCEP4

- pCEP4/SEAP : Plasmid pCEP4 mit sekretorischer, alkalischer Phosphatase als Reporter (Invitrogen)
- pCEP4/SPA4CT: Plasmid pCEP4 mit der cDNA des humanen SPA4CT ([Dyrks et al., 1992](#))
- pCEP4/695, 751 bezeichnen die entsprechenden Plasmide, die für die APP- Isoformen APP695 bzw. APP751 kodieren ([Weidemann et al., 1989](#))
- pCEP4/695sw,751sw bezeichnen die entsprechenden Plasmide, die für die APP-Isoformen APP695 bzw. APP751 mit der schwedischen Mutation kodieren ([Urmoneit, 1996](#))

3. Methoden

3.1. Mikrobiologische Techniken

3.1.1. Herstellung kompetenter Zellen

Zunächst wurde eine Vorkultur von *E.coli* DH5 α über Nacht angelegt. Diese Vorkultur wurde 100fach in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer bestimmten Zelldichte kultiviert. Die Zelldichte wurde durch Messung der Absorption bei 600 nm mit 1 mm-Küvetten bestimmt und sollte zwischen O.D. 0,6 - 0,9 im optimalen Bereich liegen. Die Zellen wurden nach Erreichen dieser Zelldichte für 5 min auf Eis inkubiert, anschließend durch Zentrifugation (2500xg, 5 min, 4°C) geerntet, und das Zellsediment in 20 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Zellen erneut zentrifugiert (2500xg, 5 min, 4°C), anschließend in 5 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung und 1 ml 100 % Glycerol resuspendiert und für mindestens 3 h auf Eis inkubiert. Die nun kompetenten Bakterienzellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.2. Transformation von Bakterien

Nach Auftauen der kompetenten Zellen (100 μ l) auf Eis wurden 1 bis 100 ng DNA zu der Zellsuspension gegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte für 1 min ein Hitzeschock bei 42°C und eine erneute Inkubation für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 μ l LB-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C inkubiert, 50 - 100 μ l der Suspension direkt auf LB-Ampicillin-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2. DNA-Techniken

3.2.1. Präparation von Plasmid-DNA

Lösungen :

Puffer P1 : 100 μ g RNase A/ml, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA

Puffer P2 : 200 mM NaOH, 1 % w/v SDS

Puffer P3 : 3 M Na-Acetat, pH 5,5

Puffer QBT : 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % v/v Ethanol, 0,15 % v/v TritonX-100

Puffer QC : 1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % v/v Ethanol

Puffer QF : 1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 15 % v/v Ethanol

TE-Lösung : 100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA

Die präparative Reinigung von Plasmid-DNA wurde nach dem Protokoll von QIAGEN (Hilden) durchgeführt. Diese basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse ([Birnboim & Doly, 1979](#)) und nutzt die selektive Bindung von Nukleinsäuren an das Qiagen-Anionenaustauscherharz.

Es wurden 200 ml einer Bakterienkultur in LB-Medium bei 4°C zentrifugiert (10 min, 2500xg) und in 10 ml P1 resuspendiert. Hierzu wurden 10 ml P2 gegeben, vorsichtig gemischt, 5 min bei RT inkubiert, nach Zugabe von 10 ml eiskalten P3 sofort vorsichtig gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Präparation wurde in Falcon-Röhrchen bei 4°C abzentrifugiert (30 min, 2500xg) und der klare Überstand auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte QIAGEN-tip 500-Säule überführt. Die Säule wurde danach zweimal mit Puffer QC gewaschen, und die DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde bei RT mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt, sofort bei 15000xg (4°C, 30 min) zentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert, luftgetrocknet und in Bidest aufgenommen. Um die Konzentration der DNA in wässrigen Lösungen zu bestimmen, wurde die optische Dichte (O.D.) bei einer Wellenlänge von 260 und

280 nm in einem UV/VIS Spektrometer Lambda 2 der Firma Perkin Elmer oder im Pharmacia GeneQuant RNA/DNA-Calculator mittels einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke d von 1 cm bestimmt. Die Konzentration der DNA ([Sambrook et al., 1989](#)) berechnet sich aus der Formel

$$[\mu\text{g} / \text{ml}]dsDNA = \frac{50 \times \text{Verdünnung} \times O.D._{260\text{nm}}}{1000}$$

Der Quotient zwischen O.D.260 und O.D.280 sollte in etwa zwischen 1 und 2 betragen (Schichtdicke der Küvette d = 1 cm), um Proteinkontaminationen der DNA festzustellen.

3.2.2. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde nach Herstellerangaben im entsprechenden Inkubationspuffer durchgeführt (Boehringer Mannheim). Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNA-Probenpuffer (siehe 3.2.3.) gestoppt.

3.2.3. Elektrophoretische Auftrennung der DNA

([Sambrook et al., 1989](#))

Lösungen :

TBE-Lösung : 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
Ethidiumbromid-Lösung : 10 mg Ethidiumbromid/ml in Bidest
DNA-Probenpuffer : 2,5 M Harnstoff, 0,25 M EDTA, 25 % w/v Saccharose,
5 % w/v SDS, 0,1 % w/v Bromphenolblau, pH 8,0

Die Agarose (1,5 % w/v) wurde in TBE-Lösung suspendiert und aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 70°C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg Ethidiumbromid/ml versetzt und in eine geeignete Plexiglasform gegossen. Das erstarrte Gel wurde in eine horizontale Flachbett-Apparatur (BioRad) mit TBE-gefüllter Laufkammer eingesetzt, die DNA-Proben in DNA-Probenpuffer aufgetragen und bei 80-100 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die DNA-Fragmente mit UV-Licht anhand des fluoreszierenden, interkalierten Ethidiumbromids detektiert. Zur Dokumentation wurde bei Anregung der Fluoreszenz auf einem Transilluminator ($\lambda = 254 \text{ nm}$) mit einer Videokamera über das E.A.S.Y. RH3-System (HeroLab) ein digitalisiertes Bild erzeugt und auf einem Video Copy Processor (Mitsubishi) ausgedruckt.

3.3. Zellkultur-Techniken

3.3.1. Isolierung und Kultivierung primärer Astrozyten

([McCarthy & DeVellis, 1980](#); modifiziert)

Lösungen :

HBSS-1 : Hanks gepufferte Salzlösung, ohne Ca^{2+} - und Mg^{2+}
DMEM-Medium : 450 ml DMEM-Medium, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin-/ Streptomycin-Lösung

Für die Präparation von Astrozyten wurde das Gesamthirn von P3-Ratten (3 Tage postnatal) verwendet. Nach Dekapitation der Ratte wurde die Kopfhaut entfernt und die Schädelkalotte abgehoben. Das freiliegende Hirn wurde entnommen, in HBSS-1 auf Eis überführt und von Meningen befreit. Die gesammelten Hirne wurden mit einem Skalpell grob zerkleinert, in ein Falcon-Röhrchen mit 2 ml Trypsin-Lösung pro Hirn überführt und für 15 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die Zellsuspension des trypsinisierten Gewebes wurde mit dem zweifachen Volumen DMEM-Medium versetzt und anschließend mittels einer 10 ml-Pipette trituiert. Die dissoziierte Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (Maschenweite 0,2 µm, Falcon) filtriert, und das Filtrat für 10 min bei 150xg (bei RT) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde vorsichtig in DMEM-Medium resuspendiert und pro Hirn auf je eine Kulturflasche (75 cm² Kulturoberfläche, Cellstar Greiner) mit DMEM-Medium verteilt. Nach 18-24 h Inkubation bei 37°C in 5 % CO₂ und 95 % wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Zellkulturschrank erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem DMEM-Medium, und im Verlauf der weiteren Kultivierung ein Mediumwechsel alle 2 bis 3 Tage. Bei verstärktem Wachstum von Mikroglia auf dem Astrozyten-Monolayer konnten diese durch leichtes Trypsinisieren oder durch eine zweistündige Inkubation der Kulturflaschen auf einem Orbitalschüttler abgelöst werden. Durch diese Kultivierungsbedingungen ließen sich weitgehend homogene Astrozyten-Kulturen gewinnen, die nach 1 bis 2 Wochen mit Substanzen behandelt (siehe 3.3.11.) und biochemisch analysiert werden konnten.

3.3.2. Isolierung und Kultivierung primärer Neurone

([Levi et al., 1984](#); modifiziert)

Lösungen :

- Poly-L-Lysin-Lösung : 100 mg Poly-L-Lysin/ml in PBS
- HBSS-1-Lösung : Hank's gepufferte Salzlösung, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺
- HBSS-2-Lösung : Hank's gepufferte Salzlösung, mit Ca²⁺ und Mg²⁺
- Trypsin/DNase-Lösung : 1 % w/v Trypsin, 0,1 % w/v DNase (0,5 g Trypsin, 25 ml 0,2 % w/v DNase, mit HBSS-1 auf 50 ml auffüllen)
- DNase-Lösung : 0,1 % w/v DNase-Lösung (100 mg DNase in 100 ml HBSS-1)
- BME-Medium : 450 ml BME, 50 ml Pferdeserum, 5 ml 2,5 M KCl, 2 mM L-Glutamin, 2 ml Penicillin-/Streptomycin-Lösung

Zunächst wurden die Zellkulturschalen vorbereitet: Hierzu wurden am Vortag der Präparation die Schalen (d = 6 cm) mit einer Poly-L-Lysin-Lösung bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Unmittelbar vor Beginn der Präparation wurden die beschichteten Schalen zweimal mit sterilem Wasser und einmal mit BME-Medium gewaschen, und jeweils 1 ml BME-Medium in die Schalen vorgelegt.

Für die Präparation von Neuronen wurden Cerebelli von P3-Ratten genommen. Hierzu wurde das Gehirn, wie unter 3.3.1. beschrieben, entnommen, das Cerebellum vom Gesamthirn abgetrennt und in HBSS-2 auf Eis gelagert. Nach Entfernung der Meningen wurde das Gewebe mittels Skalpell grob zerkleinert, in ein Falcon-Röhrchen mit 500 µl Trypsin/DNase-Lösung pro Cerebellum überführt und für 8 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe dreimal mit HBSS-1 gewaschen. Nach Abnahme des letzten Überstandes erfolgte die Trituration des Gewebes mit 400 µl DNase-Lösung pro Cerebellum zunächst mit einer 5 ml-Pipette, anschließend mit einer feuergeglätteten Pasteurpipette und als letztes mit einer ausgezogenen, feuergeglätteten Pasteurpipette. Die so vereinzelter Zellen wurden nach Zugabe von vierfachem Volumen BME-Medium für 10 min bei 50xg (4°C) zentrifugiert. Nach wiederholtem Waschen mit BME-Medium wurden die Zellen vorsichtig in BME-Medium resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde für die Zellzahlbestimmung in der Schilling-Zählkammer verwendet. Danach wurde die Zellsuspension mit BME-Medium auf eine Zelldichte

von ca. 1×10^5 Zellen/ml verdünnt und zu je 1 ml auf die vorbereiteten Schalen verteilt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C im Zellkulturschrank wurde dieses Medium vollständig abgenommen und durch frisches BME-Medium ersetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, indem 1 ml des konditionierten Mediums aus der Zellkulturschale abgenommen und 1 ml frisches BME-Medium mit 2 µM Cytosinarabinosid hinzugegeben wurde. Die Zugabe des Zytostatikums Cytosinarabinosid in der Endkonzentration von 1 µM diente der Unterdrückung der glialen Proliferation und wurde immer bei einem Mediumwechsel alle 2 bis 3 Tage dem Medium zugesetzt.

3.3.3. Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien CCF-STTG1, H4 und Sy5y erfolgte bei 37°C in 5 % CO₂ und 95 % wasserdampfgesättigte Atmosphäre in einem Zellkulturschrank (Heraeus). Die nachfolgenden Angaben beziehen sich auf Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm (Primaria, Falcon). Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank mit sterilen Lösungen durchgeführt.

Kultivierungsmedien für die Zelllinien:

CCF-STTG1: 450 ml DMEM-Medium, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin-/ Streptomycin-Lösung

H4 : 450 ml DMEM-Medium, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin-/ Streptomycin-Lösung

Sy5y : 225 ml MEM-Medium, 225 ml Nutrient-Mixture-Ham's F12-Medium, 50 ml FCS, 5 ml nicht essentielle Aminosäure-Lösung, 2 ml Penicillin-/Streptomycin-Lösung

Die Zelllinie CCF-STTG1 wurde aus einem Astrozytom (Grad IV) einer 68jährigen kaukasischen Frau isoliert. Bei der humanen Neurogliom-Zelllinie H4 handelt es sich um ein Neurogliom eines 37jährigen kaukasischen Mannes. Die humane adrenerge Neuroblastom-Zelllinie SH-Sy5y ist ein Subklon der Zelllinie SK-N-SH ([Biedler et al., 1973](#)) und stammt aus dem Rückenmark einer jungen Frau. Alle Zelllinien wurden mit dem MycoTect-Kit (Life Technologies) auf Mykoplasmen-Kontamination untersucht und als Mykoplasmen-frei identifiziert.

Das Kultivierungsmedium wurde alle 2 bis 3 Tage gegen frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium ausgetauscht. Bei einer Konfluenz von 90 bis 100 % wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturschale abgelöst und vereinzelt, indem die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann 5 bis 15 min in 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C im Zellkulturschrank inkubiert wurden. Durch Zugabe von 8 ml Kultivierungsmedium wurde die Trypsinierung gestoppt und die Zellen auf neue Zellkulturschalen in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:10 (je nach Zelldichte und Zelltyp) verteilt.

3.3.4. Kultivierung stabil transfizierter Zelllinien

Die Kultivierung der stabil transfizierten Sy5y-Zellen mit den Konstrukten pCEP4/ SPA4CT, pCEP4/APP751 oder pCEP4/APP751sw erfolgte wie in 3.3.3. beschrieben, jedoch mit einem Selektionsmedium (225 ml MEM, 225 ml Nutrient Mixture Ham's F12, 50 ml FCS, 5 ml nicht essentielle Aminosäure-Lösung, 2 ml Penicillin-/Streptomycin-Lösung und 300 µg Hygromycin B/ml).

Die Kultivierung der mit den Konstrukten pCEP4/SPA4CT, pCEP4/APP695, pCEP4/APP695sw, pCEP4/APP751 oder pCEP4/APP751sw stabil transfizierten humanen Neurogliom-Zellen H4 wurde ebenso wie unter 3.3.3. beschrieben mit einem Selektionsmedium (450 ml DMEM, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin-/Streptomycin-Lösung und 500 µg Hygromycin B/ml) durchgeführt.

3.3.5. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Die Zellen sollten in der logarithmischen Phase (80 bis 90 % Konfluenz) eingefroren werden. Alle Angaben beziehen sich auf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und von der Zellkulturschale entweder durch Abspülen mit Kultivierungsmedium oder durch Trypsinierung mit Trypsin-EDTA-Lösung (wie unter 3.3.3. beschrieben) abgelöst und in Falcon-Röhrchen überführt. Nach anschließender Zentrifugation (10 min bei 100xg, RT) wurde das Zellsediment vorsichtig in 1 ml Einfriermedium mit Glycerol (Life Technologies) pro Zellkulturschale resuspendiert und in ein Kryo-Schraubkappengefäß (1-2 ml) gefüllt. Die Zellsuspension wurde 1 h auf Eis inkubiert, für 18 bis 24 h bei -20°C und dann für weitere 18 bis 24 h bei -80°C gelagert (die Zellen sollten gleichmäßig und langsam abkühlen). Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff (-192°C) überführt und dort gelagert.

3.3.6. Auftauen kryokonservierter eukaryotischer Zellen

Die eingefrorenen Zellen im Kryo-Schraubkappengefäß wurden direkt vom flüssigen Stickstoff in ein 37°C-Wasserbad überführt, aufgetaut, in 10 ml Kultivierungsmedium aufgenommen und auf eine Zellkulturschale (d = 10 cm) verteilt. Am nächsten Tag erfolgte Mediumwechsel mit dem entsprechenden Kultivierungsmedium.

3.3.7. Metabolische Markierung von Zellen mit L-[³⁵S]-Methionin

Lösungen :

Markierungsmedium : MEM-Medium (ohne L-Glutamin, Methionin), 2 mM L-Glutamin

Zum Nachweis von Proteinen in Zellen und Kulturüberständen wurden die Proteine metabolisch durch Einbau von radioaktiv markiertem L-[³⁵S]-Methionin markiert. Hierdurch wurde eine qualitative und quantitative Analyse der Proteinsyntheseleistung kultivierter Zellen möglich.

Die Zellen wurden in einer Zellkulturschale mit 6 cm Durchmesser bei einer 70 bis 90%igen Konfluenz für die radioaktive Markierung eingesetzt. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit dem Methionin-freien Markierungsmedium gewaschen und mit 1,5 ml Markierungsmedium für 30 min bei 37°C in 5 % CO₂ und 95 % wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Zellkulturschrank inkubiert. Nach dieser Vorinkubation, in der die Zellen aufgrund des Methionin-Mangels hungern sollten, wurde diesem Medium 150-300 µCi L-[³⁵S]-Methionin (< 1000 Ci/mM) zugesetzt. Nach einer 3-4 stündigen Inkubation der Zellen im Zellkulturschrank (37°C, 5 % CO₂ und 95 % wasserdampfgesättigter Atmosphäre) konnten die Zellen dann entweder nach der Zellernte oder direkt in der Zellkulturschale (siehe 3.4.2.) lysiert werden. Das konditionierte Medium und der Lysatüberstand wurden bei -20°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Für eine quantitative Auswertung wurden 5 µl des Lysatüberstandes mit Aceton gefällt, das Präzipitat nach Zentrifugation (10 min, 13.000xg, 4°C) in 1 ml Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und die Einbaurate von [³⁵S] im Szintillationsmeßgerät (LKB Wallac 1209 Rackbeta Liquid Scintillation Counter) bestimmt.

3.3.8. Bestimmung der Zellvitalität durch Messung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (MTS-Test)

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen mit Hilfe des „CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ oder auch kurz „MTS-Test“ der Firma Promega gemessen. Dieser Test mißt die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen, die das Substrat MTS (3-(4,5-Dimethylthiozol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)2H-tetrazoliumsalz) mit Hilfe des Elektronenfängers PMS (Phenazin-Methosulfat) zu Formazan umwandeln. Die Umsetzung von MTS zu Formazan kann

photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen werden und ist direkt proportional zur Anzahl an lebenden Zellen in der Mikrotiterplatte.

Nachdem die Zellen in einer Mikrotiterplatte (96well) kultiviert wurden, erfolgte nach entsprechender Behandlung der Zellen mit Substanzen ein Mediumwechsel mit dem Kultivierungsmedium zu je 100 µl pro Vertiefung. Danach wurden jeweils 20 µl Substratlösung (2 ml MTS + 100 µl PMS) zu den Zellen gegeben und bis zu einer ausreichenden Farbreaktion im Zellkulturschrank bei 37°C in 5 % CO₂ und 95 % wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm im ELISA-Reader (Dynatech MR5000) gemessen.

3.3.9. Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die Transfektion eukaryotischer Zellen wurden kationische Liposomen eingesetzt. Hierbei reagieren positiv geladene Liposome ([Felgner et al., 1987](#)) spontan mit der DNA oder RNA und bilden Komplexe, die mit der Zellmembran fusionieren und durch Endozytose in die Zelle gelangen. Aus dieser Fusion resultiert eine Aufnahme und Expression der DNA.

Lösungen :

Kultivierungsmedium : 450 ml DMEM-Medium, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin-/ Streptomycin-Lösung

Selektionsmedium : 500 µg Hygromycin B/ml Kultivierungsmedium

Die Transfektionseffizienz von humanen Astrozytom-Zellen (CCF-STTG1), humanen Neurogliom-Zellen (H4) und primären Astrozyten wurde mit Hilfe des Konstruktes pCEP4/SEAP optimiert, wobei die Sekretion von SEAP (*sekretorische alkalische Phosphatase*) mit Hilfe des SEAP-Nachweissystems (siehe 3.4.17.) detektiert wurde. Bei der Zelllinie CCF-STTG1 wurde ermittelt, daß in 6 cm-Zellkulturschalen bei 4 µg DNA und 24 µl Lipofektin (Life Technologies) die Transfektionseffizienz am höchsten ist, während bei der Zelllinie H4 die höchste Transfektionseffizienz durch Zugabe von 4 µg DNA und 16 µl Lipofektin erfolgte. Bei primären Astrozyten wurde eine maximale Transfektion bei 2 µg DNA und 8 µl Lipofektin erreicht. Ein weiteres Kriterium für die optimale Expression der DNA war eine 60 bis 70 %ige Konfluenz der Zellen. Als DNA wurden die APP-Konstrukte eingesetzt, die in Kapitel 2.9. beschrieben sind.

Die Transfektionen wurden immer in 6 cm-Zellkulturschalen durchgeführt. Zunächst wurden DNA und Lipofektin getrennt voneinander in jeweils 750 µl Opti-Mem-1-Medium in einem Polystyrolröhrchen verdünnt, anschließend vereinigt und für 30 min bei RT vorinkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit Opti-Mem-1-Medium gewaschen, um das FCS aus dem Kultivierungsmedium zu entfernen. Danach wurde der DNA-Lipofektin-Ansatz auf die Zellen gegeben und für 5 h im Zellkulturschrank bei 37°C in 5 % CO₂ und 95 % wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Anschließend erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel mit dem Kultivierungsmedium. Nach 24 h wurde erneut das Medium gewechselt und nach weiteren 24 bis 48 h bei einer transienten Transfektion die Proteinexpression analysiert bzw. bei einer stabilen Transfektion das Selektionsmedium zu den Zellen gegeben. Unter Selektionsdruck wurden damit die DNA-exprimierenden Zellen bis zur Konfluenz kultiviert, wobei die notwendige Konzentration des Selektionsmarkers vorher getestet wurde. Auf eine Zellklonierung konnte aufgrund des episomal replizierenden Konstruktes pCEP4 verzichtet werden.

3.3.10. Behandlung der Zellen mit Substanzen

Für die Behandlung von Zellen mit Substanzen wurden diese 1 bis 2 Tage vorher mit gleicher Zellzahl auf die jeweiligen Zellkulturschalen ausgesät. Nach Erreichen einer ca. 90 % bis 100 %igen Konfluenz erfolgte ein Mediumwechsel mit dem entsprechenden Kultivierungsmedium und die Inkubation mit den Substanzen für 18 bis 24 h bei einem Endvolumen von

1,5 ml bei Zellkulturschalen mit d = 6 cm

1,0 ml bei Zellkulturschalen mit d = 3 cm

200 µl pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte (96well).

Bei metabolischer Markierung wurden die Zellen bereits während der Hungerphase mit den Substanzen behandelt. Die Substanzen wurden gemäß der Herstellervorschrift angesetzt und gelagert.

3.4. Protein-Analytik

3.4.1. Aufarbeitung des Gewebematerials

Lösungen :

Lysepuffer : 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % v/v Triton X-100, 1 % v/v NP-40, 1/25 Volumen 25fach Protease- Inhibitor-Mix

25fach Protease-Inhibitor-Mix-Lösung : 1 Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette in 2 ml Lysepuffer (inhibiert verschiedene Serin-, Cystein-, Metalloproteinasen sowie Calpaine)

Das grob zerkleinerte, tiefgefrorene Gewebe wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 ml eiskaltem Lysepuffer pro 200 mg Gewebe mittels eines Mikropistills (Eppendorf) homogenisiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde das lysierte Material bei 4°C und 5000xg für 10 min zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde für weitere Analysen bei -20°C gelagert.

3.4.2. Aufarbeitung des Zellkulturmaterials

Lösungen :

Mediumpuffer : 250 mM Tris/HCl, pH 8,0, 5 % v/v Triton X-100, 5 % v/v NP-40, 1/10 Volumen 10fach Protease-Inhibitor-Mix

Lysepuffer : siehe 3.4.1.

10fach Protease-Inhibitor-Mix-Lösung : 1 Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette in 5 ml Mediumpuffer

Weniger stark adhärente Zellen wie z.B. Sy5y-Zellen wurden im konditionierten Medium abgeschabt, zentrifugiert (5 min, 80xg, 4°C) und das Zellsediment in 200 bis 400 µl eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Stark adhärente Zellen wie z.B. primäre Astrozyten und Neurone, CCF-STTG1- und H4-Zellen wurden in der Zellkulturschale lysiert. Hierfür wurden 200 bis 400 µl eiskalter Lysepuffer zu den mit PBS gewaschenen Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zellkerne (10 min, 5000xg, 4°C) wurde der Lysatüberstand für weitere Analysen bei -20°C aufbewahrt. Das konditionierte Medium wurde mit 1/10 Volumen 10fachem Protease-Inhibitor-Mix versetzt und bei -20°C gelagert.

3.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Lösungen :

Lösung A* : 1 ml Lösung A + 20 µl Lösung S

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels DC Protein Assay (Bio Rad). Zu 25 µl Proteinlösung wurden 125 µl Lösung A* und 1 ml Lösung B pipettiert. Nachdem die Probe gut durchmischt wurde (Vortex), erfolgte eine Inkubation dieses Ansatzes für 15 min bei Raumtemperatur. Die Extinktion wurde bei 750 nm in einem UV/VIS Spektrometer Lambda 2 von Perkin Elmer ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Eichgerade mit Gamma-Globulin oder BSA bekannter Konzentration.

3.4.4. Proteinfällung mit Aceton

Lösungen :

Probenpuffer 3fach : 186 mM Tris/HCl, pH 6,8, 6 % w/v SDS, 6 % v/v β-Mercaptoethanol, 30 % v/v Glycerol, 0,03 % w/v Bromphenolblau

Der Lysatüberstand wurde mit 5 bis 6fachem Volumen eiskaltem Aceton versetzt und für 30 min bei -80°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 13000xg, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 8 M Harnstoff gelöst. Nach Zugabe von Probenpuffer wurde die Proben für 30 min bei 57°C hitzedenaturiert und konnten nach Abkühlung auf RT für die Gelelektrophorese (siehe 3.4.8. bis 3.4.11.) eingesetzt werden.

3.4.5. Immunpräzipitation radioaktiv markierter Proteine

([Mönning et al., 1990](#), [Mönning et al., 1992](#))

Die Immunpräzipitation (IP) beruht auf der hohen spezifischen Affinität der Fab-Region von Antikörpern zu dem entsprechenden Antigen ([Dobbenstein et al., 1979](#)). Die Immunpräzipitation eignet sich deshalb besonders gut zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus einer heterogenen Proteinsuspension. Die Präzipitation des Antikörper-Antigen-Komplexes kann durch Protein A-Sepharose erfolgen.

Lösungen :

PBS-SDS : PBS, pH 7,5, 0,4 % w/v SDS,

Waschpuffer A : 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA,
0,4 % v/v NP-40, 0,4 % v/v Triton X-100

Waschpuffer B : 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5 % v/v NP-40

Waschpuffer C : 10 mM Tris/HCl, pH 7,5

Protein-A Sepharose : 100 mg Protein A-Sepharose/ml TBST

TBST : 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % v/v Tween 20

Probenpuffer 3fach : 186 mM Tris/HCl, pH 6,8, 6 % w/v SDS, 6 % w/v β-Mercaptoethanol, 30 % v/v Glycerol, 0,03 % w/v Bromphenolblau

Der nach der Lyse von metabolisch markierten Zellen erhaltene Lysatüberstand (siehe 3.4.2.) wurde 1:2 mit PBS-SDS-Lösung verdünnt, und das konditionierte Medium mit 1/10 Volumen 10fachem Proteasen-Inhibitor-Mix-Lösung (siehe 3.4.2.) und 1/100 Volumen 20 % SDS-Lösung versetzt. Konditioniertes Medium und Lysatüberstand wurden für 2 h einer Vorpräzipitation mit jeweils 10 µl Präimmunserum und 50 µl Protein A-Sepharose unterzogen, um unspezifisch

bindende Proteine abzutrennen. Nach Zentrifugation (5 min, 3000xg) wurde das Sediment aus der Vorpräzipitation verworfen. Die Hauptpräzipitation erfolgte nach Zugabe von Antikörper (1:150 anti-FdAPP, 1:100 anti-A4CT, 1:150 anti-A β (1-6), 1:150 anti-A β (1-40), 1:150 anti-A β (1-42)) und 30 μ l Protein A-Sepharose bzw. anti-IgG-Maus-gekoppelter Protein A-Sepharose bei Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (siehe 3.4.7.) für 1,5 h bei RT im Überkopfschüttler. Anschließend wurde die mit den Immunkomplexen beladene Protein A-Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde die Protein A-Sepharose dreimal mit 750 μ l Waschpuffer A, zweimal mit 750 μ l Waschpuffer B und einmal mit 750 μ l Waschpuffer C gewaschen. Durch Zugabe von 3fach Probenpuffer und Aufkochen (10 min, 95°C) erfolgte die Elution der Immunkomplexe und die Dissoziation der Immunglobuline von ihren Antigenen. Nach Zentrifugation der Proben (10 s, 700xg) wurde der Überstand für die Gelelektrophorese eingesetzt.

3.4.6. Immunpräzipitation nicht-radioaktiv markierter Proteine

Die Immunpräzipitation nicht-radioaktiv markierter Proteine erfolgte wie in Kapitel 3.4.5. beschrieben. Auf die intensive Waschprozedur der an Protein A-Sepharose gekoppelten Immunkomplexe wurde jedoch verzichtet. Stattdessen wurde die mit Antikörper und Antigen beladene Protein A-Sepharose dreimal mit PBS gewaschen. Auf die Vorpräzipitation mit Präimmunserum wurde verzichtet. Nach elektrophoretischer Auftrennung der reduzierten, denaturierten Proben im Polyacrylamid-Gel wurden die Proteine immunologisch im Western-Blot analysiert (siehe 3.4.14.).

3.4.7. Herstellung von anti-IgG-Maus-gekoppelter Protein A-Sepharose

Da Protein A-Sepharose zu Antikörpern der IgG1-Klasse nur eine geringe Affinität aufweist, wurde bei Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern dieser IgG-Klasse ein „Spacer“-Antikörper an die Protein A-Sepharose gekoppelt, der gegen Maus IgG gerichtet ist.

Es wurden 30 μ l Protein A-Sepharose mit 30 μ l PBS, 10 μ l polyklonalem Kaninchenserum anti-Maus-IgG und 10 μ l monoklonalem Antikörper für 1 h im Überkopfschüttler inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS wieder auf ein Gesamtvolumen von 30 μ l mit TBST aufgefüllt.

3.4.8. Tris-/Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) ([Weber & Osborn, 1969](#)). Sie erfolgt als vertikale Flachbett-Elektrophorese ([Studier, 1973](#)) in einem diskontinuierlichem Puffersystem nach dem Prinzip von Laemmli ([Laemmli, 1979](#)).

Lösungen :

Acrylamidlösung : 30 % w/v Acrylamid, 0,8 % w/v N,N-Methylbisacrylamid

Laufpuffer : 20 mM Tris/HCl, 150 mM Glycin, 0,08 % w/v SDS

7,5 %-Trenngel : 7,5 ml Acrylamidlösung, 5,6 ml 2 M Tris/HCl, pH 8,8, 16,6 ml Bidest, 150 μ l 20 % w/v SDS, 100 μ l 15 % w/v APS, 10 μ l TEMED

5 %-Sammelgel : 1,7 ml Acrylamidlösung, 1,3 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8, 7,0 ml Bidest, 50 μ l 20 % w/v SDS, 50 μ l 15 % w/v APS, 5 μ l TEMED

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen mit einer Molmasse von 50 bis 150 kDa ist ein 7,5 %iges Trenngel geeignet. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten (20 x

20 cm) gegossen, die durch Kunststoff-Spacer einen Abstand von 1 mm hatten (Aufbau Biorad). Das Trenngel wurde bis zur Polymerisation mit Isopropanol oder 0,1 % SDS überschichtet. Danach wurde das Sammelgel gegossen, in das der Probenkamm eingeschoben wurde. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die in Probenpuffer reduzierten, denaturierten Proben aufgetragen und für 4 bis 6 h bei 180 V oder über Nacht bei 60 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Molmassenstandards wurde eine vorgefärbte Proteinmischung von Sigma oder Life Technologies (siehe 2.4.) verwendet.

3.4.9. Tris-/Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese nach dem Prinzip von Schägger und Jagow ([Schägger & Jagow, 1987](#)) ist besonders für die Auftrennung von Peptiden geeignet. Die Acrylamidkonzentration der verwendeten Trenngele variiert mit dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine. Ein 10 %iges Trenngel erreicht eine gute Auftrennung von Proteinen mit einer Molmasse bis zu 10 kDa, während ein 16,5 %iges Trenngel noch Proteine mit einer Molmasse von 3 kDa gut auftrennt. Für eine gute Auftrennung im Molmassenbereich von 3 bis 180 kDa wurde ein Gradientengel (6,5 bis 16,5 %iges Trenngel) gegossen.

Lösungen :

Acrylamid-Trenngel-Lösung : 48 % w/v Acrylamid, 1,5 % w/v N,N-Methyl-bisacrylamid

Acrylamid-Sammelgel-Lösung : 46,5 % w/v Acrylamid, 3 % w/v N,N-Methylbis- acrylamid

Gelpuffer : 3 M Tris/HCl, pH 8,5, 0,3 % w/v SDS

Kathodenlaufpuffer : 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS, pH 8,3

Anodenlaufpuffer : 0,2 M Tris/HCl, pH 8,9

6,5 %iges Trenngel : siehe Tab. 3

10 %iges Trenngel : siehe Tab. 3

16,5 %iges Trenngel : siehe Tab. 3

10 %iges Spacergel : 3 ml Acrylamid-Sammelgel-Lösung, 5 ml Gelpuffer, 7 ml Bidest, 50 µl 15 % w/v APS, 5 µl TEMED

4 %-Sammelgel : 1,0 ml Acrylamid-Sammelgel-Lösung, 3,1 ml Gel-puffer, 8,4 ml Bidest, 100 µl 15 % w/v APS, 10 µl TEMED

Das Gießen des 6,5 und 10 %igen Trenngels erfolgte wie in 3.4.8. beschrieben. Bei dem 16,5 %igen Trenngel wurde zunächst das Trenngel und anschließend gleich ein 10 %iges Spacergel gegossen und mit Isopropanol oder 0,1 % SDS überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenn- bzw. Spacergels wurde das Sammelgel gegossen und der Probenkamm eingeschoben.

Tab. 3: Zusammensetzung der Tris-/Tricin-Trenngele

	6,5 % Trenngel	10 % Trenngel	16,5 % Trenngel
Gesamtvolumen	30 ml	30 ml	30 ml
Acrylamid-Trenngel-Lösung	-	-	10,0 ml
Acrylamid-Sammelgel-Lösung	4,0 ml	6,1 ml	-
Gelpuffer	10,0 ml	10,0 ml	10,0 ml
Glyzerol (70 %)	3,2 ml	3,2 ml	3,2 ml
Bidest	12,8 ml	10,7 ml	6,8 ml
15 % w/v APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die in Probenpuffer reduzierten, denaturierten Proben aufgetragen und über Nacht bei 80 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Molmassenstandard für den hohen Molmassenbereich wurden vorgefärbte Proteinmischungen von Sigma (35 bis 190 kDa) oder Life Technologies (26,6 bis 180 kDa) verwendet, für den niedrigen Molmassenbereich eine vorgefärbte Proteinmischung von Life Technologies (2,3 bis 43 kDa).

3.4.10. Tris-/Bicin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem NuPage-System

Bei der SDS-PAGE mit NuPage-Gelen handelt es sich um ein von der Firma Novex entwickeltes Fertig-Minigelsystem, das auf dem Puffersystem Bistris/HCl (pH 6,4) basiert und als Laufpuffer MES (2-Morpholinoethansulfonsäure) für eine gute Auftrennung von Proteinen mit geringem Molmasse (3 bis 185 kDa) oder MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure) für eine gute Auftrennung von Proteinen mit größerer Molmasse (12 bis 188 kDa) verwendet. Für die elektrophoretische Auftrennung mit dem NuPage-System wurden Gradientengele mit einer Acrylamidkonzentration von 4 bis 12% verwendet.

Lösungen:

MES-Anodenlaufpuffer : 50 mM MES, 50 mM Tris-Base, 0,1 % w/v SDS, 1,025 mM EDTA, pH 7,3

MOPS-Anodenlaufpuffer : 50 mM MOPS, 50 mM Tris-Base, 0,1 % w/v SDS, 1,025 mM EDTA, pH 7,7

Kathodenlaufpuffer : MES- oder MOPS-Anodenlaufpuffer mit 1/400 Volumen NuPage Antioxidant

Die in Probenpuffer reduzierten, denaturierten Proben wurden auf ein NuPage-Gradientengel aufgetragen und mit MES-enthaltenen Laufpuffer für 35 min bei 200 V und mit MOPS-enthaltenen Laufpuffer für 50 min bei 200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Molmassenstandard wurde eine vorgefärbte Proteinmischung von der Firma Novex (MultiMark Multi-colored Standard, 3 bis 185 kDa) eingesetzt.

3.4.11. Tris-/Bicin-/Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Das Puffersystem nach Wiltfang *et al.* ([Wiltfang et al., 1991](#)) verwendet Bicin und Sulfat als Trägerion und Bistris und Tris als Gegenion. Mit den üblichen gelelektrophoretischen Methoden wie z.B. SDS-Page nach Laemmli ([Laemmli, 1979](#)) oder nach Schagger und Jagow ([Schagger & Jagow, 1987](#)) kann keine Trennung der A β -Peptide (1-40) bzw. (1-42) erreicht werden. Wird jedoch ein Tris-/Bicin-Gel mit Harnstoff verwendet, so wird eine elektrophoretische Trennung der A β -Peptide (1-40) und (1-42) erreicht ([Klaeffki et al., 1996](#)), wobei das Peptid A β (1-42) im Gelsystem mit Harnstoff schneller als das Peptid A β (1-40) läuft. Die elektrophoretische Beweglichkeit von kleinen Polypeptiden wird stark von ihrer Tertiärstruktur beeinflusst ([Wiltfang et al., 1991](#)). Vermutlich wird durch die Anwesenheit von SDS und Harnstoff im Trenngel eine unterschiedliche Tertiärstruktur der (1-40)- bzw. (1-42)-Peptide ausgebildet, so daß das Laufverhalten der beiden Peptide nicht nur durch das Molekulargewicht, sondern auch durch ihre Tertiärstruktur beeinflusst wird und sich somit deutlich voneinander unterscheidet.

Lösungen :

Trenngelpuffer 4fach :	1,6 M Tris, 0,4 M H ₂ SO ₄ , pH 8,5
Spacergelpuffer 2fach :	0,8 M Bistris, 0,2 M H ₂ SO ₄ , pH 6,7
Sammelgelpuffer 2fach :	0,72 M Bistris, 0,32 M Bicin, pH 7,7
Acrylamidlösung :	57 % w/v Acrylamid, 3 % w/v N,N-Methylbisacrylamid
Probenpuffer 2fach :	0,72 M Bistris, 0,32 M Bicin, 2 % w/v SDS, 30 % w/v Saccharose, 5 % v/v 2-Mercaptoethanol, 0,01 % w/v Brom-phenolblau
Kathodenlaufpuffer :	0,2 M Bicin, 0,1 M NaOH, 0,25 % w/v SDS, pH 8,2
Anodenlaufpuffer :	0,2 M Tris, 0,05 M H ₂ SO ₄ , pH 8,1
12 %-Trenngel :	2,0 ml Acrylamidlösung, 2,5 ml Trenngelpuffer 4fach, 100 μ l 10 % w/v SDS, 4,2 g 7 M Harnstoff, auf 10 ml Endvolumen mit Bidest einstellen, 40 μ l 10 % w/v APS, 5 μ l TEMED
Spacergel :	200 μ l Acrylamidlösung, 1 ml Spacergelpuffer 2fach, 20 μ l 10 % w/v SDS, 770 μ l Bidest, 8 μ l 10 % w/v APS, 2 μ l TEMED
Sammelgel :	1,5 ml Sammelgelpuffer 2fach, 375 μ l Acrylamidlösung, 30 μ l 10 % w/v SDS, 1,068 ml Bidest, 24 μ l 10 % w/v APS, 3 μ l TEMED

Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten (8,5 x 8,5 cm), die durch Kunststoff-Spacer einen Abstand von 0,75 mm hatten, bis zu einer Höhe von max. 54 mm gegossen. Das Trenngel wurde bis zur Polymerisation mit Isopropanol oder 0,1 % SDS überschichtet. Danach wurde das Spacergel bis zu einer Höhe von max. 5 mm gegossen.

Bis zum Auspolymerisieren wurde das Spacergel mit Isopropanol oder 0,1 % SDS überschichtet. Danach wurde das Sammelgel gegossen, in das dann der Probenkamm eingeschoben wurde. Nach Auspolymerisieren des Sammelgels wurden die im oben angegebenen Probenpuffer reduzierten, denaturierten Proben aufgetragen und zunächst für 10 bis 15 min bei 10 mA/Gel und anschließend für ca. 1 h bei 20 bis 24 mA/Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenz für (1-40)- und (1-42)-Peptid wurden jeweils synthetische A β Peptide von der Firma Bachem bei jedem Gellauf eingesetzt. Nach dem Gellauf wurde zur Detektion der synthetischen Peptide das Gel mit Coomassie Blue gefärbt (siehe 3.4.12.).

3.4.12. Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Blue

([Neuhoff et al., 1988](#))

Lösungen :

Fixierer-Lösung : 0,25 % v/v Glutaraldehyd in 0,4 M Borat-/Phosphat-Puffer, pH 6,2

Färber-Lösung : 5 % w/v Coomassie Brilliant blue G250

Entfärber-Lösung : 10 % v/v Methanol, 7,5 % v/v Essigsäure

Geldry-Lösung : 30 % v/v Ethanol, 5 % v/v Glycerol

Das Gel wurde nach der Elektrophorese für 30 min in Fixierer-Lösung unter leichtem Schütteln inkubiert, und nach 2maligem Waschen mit Bidest in Färber-Lösung für 5 min inkubiert. Nach mehrmaligem Entfärben des Gels mit Entfärber-Lösung wurde das Gel für 15 min in Geldry-Lösung inkubiert und anschließend auf einem Vakuumtrockner (BioRad) bei 80°C getrocknet.

3.4.13. Autoradiographie mit Phosphorimager

Zur Analyse der ³⁵S-markierten Proteine wurde im Anschluß an die SDS-Page dieser Proteine das Gel für 1 h in Fixierer-Lösung (30 % v/v Methanol, 7 % v/v Essigsäure, 63 % Bidest) inkubiert und anschließend für 2 h auf einem Vakuumtrockner (BioRad) bei 80°C getrocknet. Das getrocknete Gel wurde dann für max. 3 Tage auf einem PhosphorScreen (Molecular Dynamics) exponiert, mittels Phosphorimager detektiert und densitometrisch durch die Software ImageQuant analysiert.

3.4.14. Western-Transfer-Analyse (Western-Blot)

([Towbin et al., 1979](#))

Lösungen :

Transferpuffer I : 20 mM Tris, 150 mM Glycine, 20 % v/v Methanol

Transferpuffer II : 25 mM Bicin, 25 mM Bistris, 1,025 mM EDTA, pH 7,2, 1/1000 Vol. NuPage Antioxidant

TBST : 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % v/v Tween 20

Absättigungs-Puffer : 1 % w/v Milchpulver in TBST

Chemolumineszenzlösung : 20 ml Lösung A, 20 ml Lösung B (NEN Life Science)

Entfärber-Puffer : 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,7, 100 mM 2-Mercaptoethanol, 2 % w/v SDS

Die in einer analytischen SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrottransfer auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell, Maschenweite 0,45 µm) übertragen. Der Transfer von Tris-/Glycin- oder Tris-/Tricin-Gelen (siehe 3.4.8. und 3.4.9.) erfolgte in einer Trans-Blot-Apparatur (Biorad) für 5 h bei 4°C und einer Stromstärke von 240 mA in Transferpuffer I. Der Western-Blot von Tris-/Bicin-Gelen (siehe 3.4.10.) erfolgte in einem Blotmodul der Firma Novex für 2 h bei 4°C und einer Spannung von 25 V in Transferpuffer II.

Die freien Bindungsstellen der aus der Western-Blot-Apparatur entnommenen Membran wurden für 1 h bei RT mit Absättigungspuffer inkubiert. Danach wurde die Membran über Nacht mit dem in Absättigungspuffer verdünntem Antiserum bei 4°C inkubiert (1:10000 MAK 22C11, 1:7000 anti-CT, 1:5000 anti-Synaptophysin, 1:5000 anti-NF-68). Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran mehrmals mit TBST gewaschen. Die Nachweis

gebundener Antikörper erfolgte für 1 h bei RT mit Peroxidase-gekoppelten Schaf-anti-Maus- bzw. Schaf-anti-Kaninchen-Antikörper (1:5000 in Absättigungspuffer). Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBST wurde die Färbereaktion durchgeführt. Für die Detektion eines Peroxidase-gekoppelten, sekundären Antikörpers wurde die zuvor kurz angetrocknete Membran für 1 min in Chemolumineszenz-Lösung inkubiert und nach erneutem Antrocknen in einer Filmkassette zusammen mit einem Film (NEN Life Science) für max. 18 h exponiert. Die Entwicklung des Film erfolgte im Hyperprocessor (Amersham).

Die Detektion von primär gebundenen Antikörpern mit Hilfe von Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern über Chemolumineszenz-Reaktion ist reversibel, d.h. man kann die an der Membran gebundenen Antikörper wieder entfernen (strippen). Hierzu wurde die Membran für 30 min in Entfärber-Puffer bei 57°C inkubiert und anschließend ausgiebig mit TBST gewaschen. Danach wurde die Membran wie oben beschrieben erneut abgesättigt, mit primären Antikörper über Nacht inkubiert und über Bindung des sekundären Antikörpers entwickelt.

3.4.15. Nachweis von Prostaglandin E2

Für die quantitative Bestimmung von Prostaglandin E2 (PGE2) im konditioniertem Medium wurde ein Enzymimmunoassay (EIA)-Kit von Amersham eingesetzt. Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven EIA mit einer Nachweisgrenze von 2,5 bis 320 pg PGE2, bei dem anti-Maus-IgG adsorptiv an die Wand der Mikrotiterplatten-Vertiefungen gebunden ist. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatten werden nacheinander konditioniertes Medium, Peroxidase-gekoppeltes PGE2 und anti-PGE2 gegeben. Dabei kommt es zu einer Konkurrenz von nicht-markiertem und markiertem PGE2 um den Antikörper. Je höher die Konzentration an PGE2 im Medienüberstand ist, desto weniger bindet Peroxidase-gekoppeltes PGE2, gebunden an anti-PGE2 an die Mikrotiterwand. Für die Quantifizierung des PGE2 im Mediumüberstand wurde ein Standard mitgeführt. Als Substrat für die Peroxidase wurde TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidinhydrogen peroxid) eingesetzt. Die Messung der Absorption erfolgt bei einer Wellenlänge von 630 nm im ELISA-Reader (Dynatech MR5000).

3.4.16. ICAM-1-ELISA

Für den semi-quantitativen Nachweis des interzellulären Adhäsionsmolekül ICAM-1 in astrozytären Zellen wurde ein Verfahren entwickelt, das auf immunhistochemischer Technik basiert. Hierbei werden Zellen in einer Mikrotiterplatte (96well) kultiviert und mit Substanzen behandelt. Nach entsprechender Induktionszeit werden die Zellen, nachdem diese zweimal mit PBS gewaschen wurden, an der Mikrotiterplattenwand fixiert, und nach Permeabilisierung mit Triton X-100 in Absättigungspuffer mit dem Antikörper anti-ICAM-1 inkubiert. Über einen biotinylierten sekundären Antikörper anti-IgG wird das Avidin-Peroxidase-Verstärkersystem von Vectastain Elite ABC Kit und ABTS als lösliches Substrat verwendet.

Lösungen :

PBS-Glycin :	PBS mit 0,1 % w/v Glycin
PBST :	PBS mit 0,2 % v/v TritonX-100
PBST-BSA :	PBST mit 1 % w/v BSA
PBST-BSA-NS :	PBST-BSA mit 1,5 % v/v Pferdeserum (Vector Lab.)
Avidin-POD :	1:100 Lösung A und 1:100 Lösung B in PBST für 30 min vorinkubieren (Vector Laboratories)
ABTS :	1 mM 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfat] in 0,1 M Phosphat-/Citrat-Puffer, pH 4,3, 0,002 % v/v H ₂ O ₂

Für den ICAM-1-ELISA wurden die mit Substanzen behandelten Zellen in einer Mikrotiterplatte (96well) nach entsprechender Induktionszeit an der Wand der Mikro-titerplattenvertiefung mit je 50 µl 4 % w/v Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert und anschließend einmal mit je 100 µl PBS-Glycin und zweimal mit je 100 µl PBS gewaschen. Nach Absättigung der freien Bindungsstellen an der Mikrotiter-plattenwand bzw. gleichzeitiger Permeabilisierung der fixierten Zellen mit jeweils 100 µl PBST-BSA-NS für 1 h bei RT wurden je 50 µl MAK anti-human-ICAM-1 (1:10000 in PBST-BSA-NS) zugegeben. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C für 18 h. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde der sekundäre Antikörper anti-Maus-IgG-Biotin (1:200 in PBST-BSA-NS) zu je 50 µl in die Vertiefungen gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST erfolgte dann die Zugabe von je 50 µl Avidin-POD. Nach 30 min bei RT wurden die Vertiefungen erneut dreimal mit PBST gewaschen. Anschließend wurde die Substratreaktion mit je 50 µl ABTS durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Reader (Dynatech MR5000).

3.4.17. Nachweis sekretorischer alkalischer Phosphatase

Lösungen :

SEAP-Puffer 2fach : 2 M Diethanolamin, 1 mM MgCl₂, 20 mM L-Homoarginin, pH 9,6

Für den Nachweis von sekretorischer alkalischer Phosphatase (SEAP) wurde das konditionierte Medium für 1 h bei 65°C inkubiert, um die endogenen alkalischen Phosphatasen zu inaktivieren. Nach Abkühlen der Proben auf RT wurden jeweils 100 µl konditioniertes Medium und 100 µl 2facher SEAP-Puffer in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben und mit je 20 µl 120 mM p-Nitrophenolphosphat in 1fach SEAP-Puffer als Substrat bis maximal über Nacht im Zellkulturschrank bei 37°C in 5 % CO₂ und 95 % wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte dann bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Reader (Dynatech MR5000).

3.4.18. Immunzytochemischer Nachweis des ICAM-1

Die immunzytochemische Detektion von ICAM-1 in astrozytären Zellen erfolgte nach dem gleichen Testprinzip wie der ICAM-1-ELISA. Die Zellen wurden jedoch auf Poly-L-Lysin-beschichteten Glas-Plättchen (Karl Hecht GmbH, Sondheim) kultiviert. Die Beschichtung mit Poly-L-Lysin erfolgte durch eine Inkubation der runden Deckgläser mit 100 mg Poly-L-Lysin/ml in PBS über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen der Glas-Plättchen mit PBS wurden die Zellen darauf ausgesät und entsprechend mit Substanzen behandelt. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und nach Zugabe des primären Antikörpers (1:1000 MAK anti-human-ICAM-1) konnte dieser über das Avidin-Peroxidase-System (Vectastain Elite ABC Kit, Maus IgG) wie in 3.4.16. beschrieben detektiert werden. Als unlösliches Substrat für die Peroxidase wurde jedoch DAB (1,3 mM Diaminobenzidin [3,4,3',4'-Tetraaminobiphenyltetrahydrochlorid] in PBS mit 0,02 % v/v H₂O₂) verwendet. Die Substratreaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS beendet.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen zur Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in Astrozyten

4.1.1. Übersicht und Fragestellung

Charakteristische neuropathologische Merkmale der Alzheimer-Krankheit sind senile Plaques, die von aktivierten Astrozyten und Mikroglia umgeben sind. Astrozyten sind in der Lage, im aktivierten Zustand zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren zu sekretieren, die zu einer Verstärkung inflammatorischer Prozesse führen können. Neben diesen bereits gut untersuchten sekretorischen Faktoren produzieren Astrozyten im aktivierten Zustand noch zahlreiche Immunrezeptoren, dessen Expressionsverhalten in Astrozyten im Hinblick auf die Alzheimer-Pathogenese noch wenig charakterisiert ist. Von besonderer Bedeutung für die Alzheimer-Pathogenese ist das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1, da es mit amyloidogenen Ablagerungen im Hirn von Alzheimer-Patienten assoziiert vorliegt ([Akiyama et al., 1993](#); [Eikelenboom et al., 1994](#); [Verbeek et al., 1994](#)). ICAM-1 gehört zur Immunglobulin-Superfamilie der Adhäsionsrezeptoren, deren Liganden die β 2-Integrine LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen*) und MAC-1 (*macrophage antigen*) sind. Welche Rolle ICAM-1 in der Alzheimer-Pathogenese spielt, ist bisher noch nicht untersucht worden. Um einen ersten Hinweis auf eine mögliche pathophysiologische Rolle des ICAM-1 in der Alzheimer-assoziierten Neuroinflammation zu erhalten, wurde die astrozytäre ICAM-1-Expression in Abhängigkeit unterschiedlicher Mitogene untersucht, die für die Alzheimer-Pathogenese von Bedeutung sind (siehe Einleitung, Kap. 1.4.).

4.1.2. ICAM-1 als Marker für die astrozytäre Aktivität

Wie einige Veröffentlichungen belegen, wird ICAM-1 auch unter Zellkulturbedingungen von Astrozyten exprimiert ([Frohman et al., 1989](#); [Kuppner et al., 1990](#)). Mit Hilfe von primär kultivierten Astrozyten konnte bereits gezeigt werden, daß Lipopolysaccharide sowie die Zytokine TNF α und IL1 β die ICAM-1-Expression verstärken ([Ballestas & Benveniste, 1995](#)). Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente sollten prüfen, ob die ICAM-1-Expression in der astrozytären Zelllinie CCF-STTG1 durch die Zytokine IL1 β oder TNF α , die mit amyloidogenen Ablagerungen assoziiert sind, beeinflussbar ist, und inwieweit diese Zellen für die Untersuchung der astrozytären Aktivität geeignet sind.

Für die immunzytochemische Untersuchung der ICAM-1-Expression wurden humane Astrozytom-Zellen (CCF-STTG1) auf Poly-L-Lysin-beschichteten Glasplättchen kultiviert. Die Zellen wurden bei einer 50 %igen Konfluenz mit 100 U IL1 β /ml oder 50 ng TNF α /ml für 18 h behandelt (siehe 3.3.10.). Anschließend wurde eine immunzytochemische Färbung mit dem monoklonalen Antikörper anti-human-ICAM-1 durchgeführt (siehe 3.4.18.). Wie aus Abb. 6 hervorgeht, ist eine starke ICAM-Färbung in Astrozyten zu beobachten, die mit IL1 β und TNF α behandelt wurden.

Um die immunzytochemischen Ergebnisse zu verifizieren, wurde die Expression von ICAM-1 mittels Immunpräzipitation nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden CCF-STTG1-Zellen während einer metabolischen Markierung mit jeweils 200 μ Ci [35 S]-Methionin (siehe 3.3.7.) für 6 h mit 100 U IL1 β /ml oder 50 ng TNF α /ml in Markierungsmedium behandelt (siehe 3.3.10.). Nachdem die Zellen in der Zellkulturschale lysiert wurden, erfolgte die Immunpräzipitation von ICAM-1 aus dem Zellysat mit anti-Maus-IgG-gekoppelter Protein A-Sepharose (1:40 anti-human-ICAM-1; siehe 3.4.5. und 3.4.7.). Anschließend wurden die hitzedenaturierten, auf gleiche Proteinmenge angeglichenen Immunpräzipitate in einem 10 %igem Tris-/Tricin-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.4.9.). Nach Fixierung und Trocknung des Gels erfolgte die Exposition auf einem Phosphorscreen und die autoradiographische Analyse der Immunpräzipitate (siehe 3.4.13.). Ein repräsentatives Ergebnis der ICAM-1-Analyse ist in Abb. 7 dargestellt. Im Zellysat TNF α - und IL1 β -behandelter Astrozyten zeigte sich deutlich eine immu-



Abb. 6 : Immunzytochemische Detektion von ICAM-1 in Astrozyten, die mit unterschiedlichen Mitogenen für 18 h behandelt wurden (freundlicherweise von G. Bodewitz, Schering AG, zur Verfügung gestellt). **A.** unbehandelte CCF-STTG1-Zellen, **B.** CCF-STTG1-Zellen, mit 100 U IL1 β /ml behandelt, **C.** CCF-STTG1-Zellen mit 50 ng TNF α /ml behandelt. Antikörper : MAk anti-human-ICAM-1 (1:1000). Vergrößerung : 400fach.

reaktive Bande im erwarteten Molmassenbereich (85 bis 180 kDa). Unbehandelte Astrozyten zeigten dagegen nur eine schwache immunreaktive Bande.

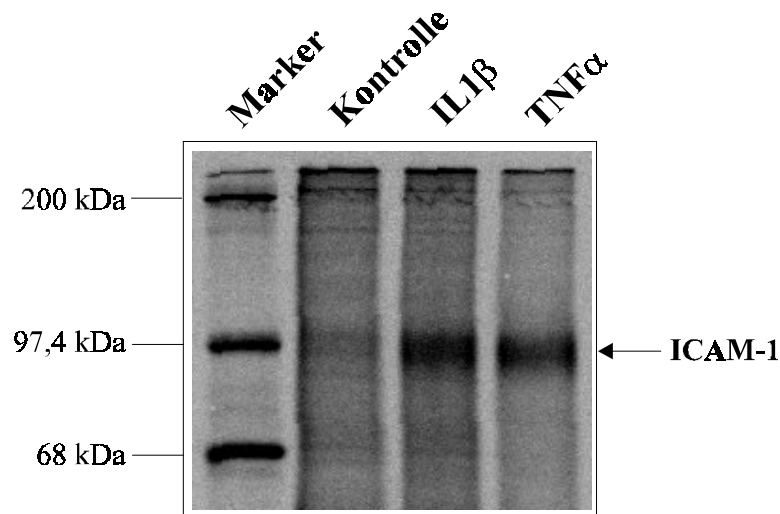


Abb. 7 : Immunpräzipitation des ICAM-1

Autoradiographie des gelelektrophoretisch aufgetrennten, mit anti-human-ICAM-1 immunpräzipitierten, ^{35}S -markiertem ICAM-1 aus Zellysat unbehandelter (Kontrolle) und Zytokin-behandelter (100 U $\text{IL1}\beta/\text{ml}$, 50 ng $\text{TNF}\alpha/\text{ml}$) humaner Astrozytom-Zellen (CCF-STTG1). Am linken Bildrand ist der Molmassenstandard eingezeichnet (Marker)

Die aus immunzytochemischen und biochemischen Analysen gewonnenen Daten zeigten, daß die Zytokine $\text{IL1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ die ICAM-1-Expression humaner Astrozytom-Zellen verstärken. ICAM-1 stellt somit ein Markerprotein für die astrozytäre Aktivität dar, die mit der Alzheimer-Pathogenese assoziiert ist.

4.1.3. Quantifizierung des ICAM-1 durch einen Zell-basierenden ELISA

Zur Quantifizierung der ICAM-1-Expression wurde ein ELISA im Mikrotiterplatten-Format entwickelt, der auf immunzytochemischen Techniken basiert. Mit Hilfe des ELISA's kann die Expression von Membran-assoziiertem ICAM-1 in Paraformaldehyd-fixierten Zellen semiquantitativ nachgewiesen werden. Um die Streuung der Einzelwerte zu ermitteln, wurde der Mittelwert (MW) der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm aus 8facher Bestimmung unbehandelter sowie Zytokin-behandelter Zellen berechnet, die Standardabweichung (SD) und der daraus resultierende Variationskoeffizient ($\text{VK in } [\%] = (\text{SD}/\text{MW}) \times 100$) ermittelt (siehe Tab. 4). Humane Astrozytom-Zellen (CCF-STTG1) wurden in Mikrotiterplatten bis zur Konfluenz kultiviert, nach einem Mediumwechsel mit 100 U $\text{IL1}\beta/\text{ml}$ oder 20 ng $\text{TNF}\alpha/\text{ml}$ für 18 h behandelt (siehe 3.3.10.) und im ICAM-1-ELISA analysiert (siehe 3.4.16).

Die Ergebnisse des ICAM-1-ELISA's korrelierten mit den Befunden aus immunzytochemischen und biochemischen Analysen der ICAM-1-Expression (siehe 4.1.2.). Die Zytokine $\text{IL1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ verstärkten die ICAM-1-Expression humaner Astrozytom-Zellen. Der ELISA zeigte eine geringe Standardabweichung und einen niedrigen Variationskoeffizienten unter 10 %.

Tab. 4 : Ermittlung der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten des ICAM-1-ELISA's

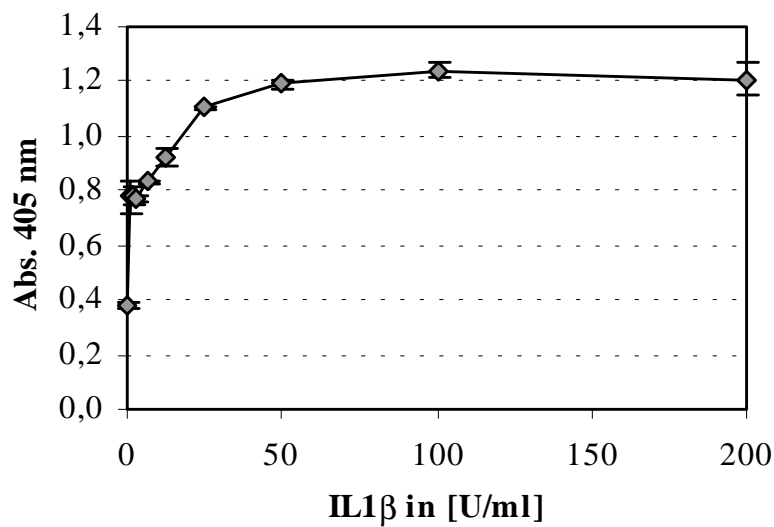
Behandlung der Zellen mit	MW	SD	VK in [%]
Kontrolle	0,536	0,034	6,3
100 U IL1 β /ml	1,037	0,082	7,9
20 ng TNF α /ml	1,188	0,099	8,3

4.1.4. Astrozytäre ICAM-1-Expression in Abhängigkeit unterschiedlicher Zytokin-Konzentrationen

Um die ICAM-1-Expression in Astrozyten näher zu charakterisieren, wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Zytokin-Wirkung untersucht. Hierfür wurden humane Astrozytom-Zellen (CCF-STTG1) in Mikrotiterplatten bis zur Konfluenz kultiviert, nach 24 h mit 0,75 bis 200 U IL1 β /ml oder mit 10 bis 50 ng TNF α /ml in frischem Kultivierungsmedium für 18 h behandelt und anschließend im ICAM-1-ELISA analysiert (siehe 4.1.3.). Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 8 dargestellt.

Die Behandlung der Astrozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL1 β und TNF α über einen Zeitraum von 18 h führte zu einer dosisabhängigen ICAM-1-Stimulation. IL1 β verstärkte bereits ab einer sehr geringen Konzentration von 0,75 U/ml die Expression von ICAM-1 um den Faktor 2,0 bis maximal um den Faktor 3,1 ab 50 U IL1 β /ml (siehe Abb. 8-1). Bei einer geringen Konzentration von 10 ng TNF α /ml wurde die ICAM-1-Expression um das 2,3fache verstärkt, während eine konstante stimulierte ICAM-1-Expression um den Faktor 2,9 erst ab einer Konzentration von 40 ng TNF α /ml erreicht wurde (siehe Abb. 8-2).

(1)



(2)

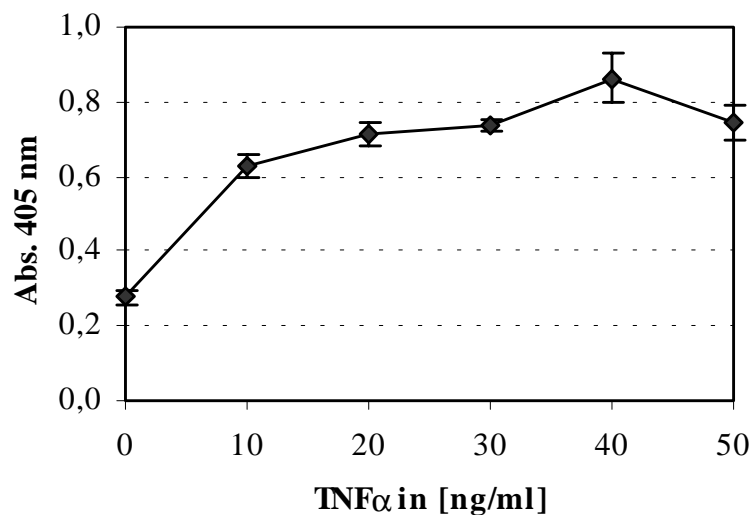


Abb. 8 : Expression des ICAM-1 in Abhängigkeit von der IL1β- und TNFα-Konzentration

CCF-STTG1-Zellen wurden mit 0,75; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 und 200 U IL1β/ml (1) bzw. mit 10, 20, 30, 40 und 50 ng TNFα/ml (2) für 18 h behandelt und im ICAM-1-ELISA analysiert. Es wurde der Mittelwert aus jeweils drei unabhängigen Experimenten und die daraus resultierende Standardabweichung berechnet.

4.1.5. Zeitverlauf der Zytokin-verstärkten ICAM-1-Expression

Um den zeitlichen Verlauf der verstärkten ICAM-1-Expression nach Behandlung humaner Astrozytom-Zellen mit Zytokinen zu verfolgen, wurden die Zellen für 2, 4, 8, 14, 18, 24, 48 und 72 h mit 100 U IL1β/ml oder 50 ng TNFα/ml behandelt und anschließend im ICAM-1-ELISA analysiert. Die Auswertung der ELISA-Daten ist in der Abb. 9 dargestellt.

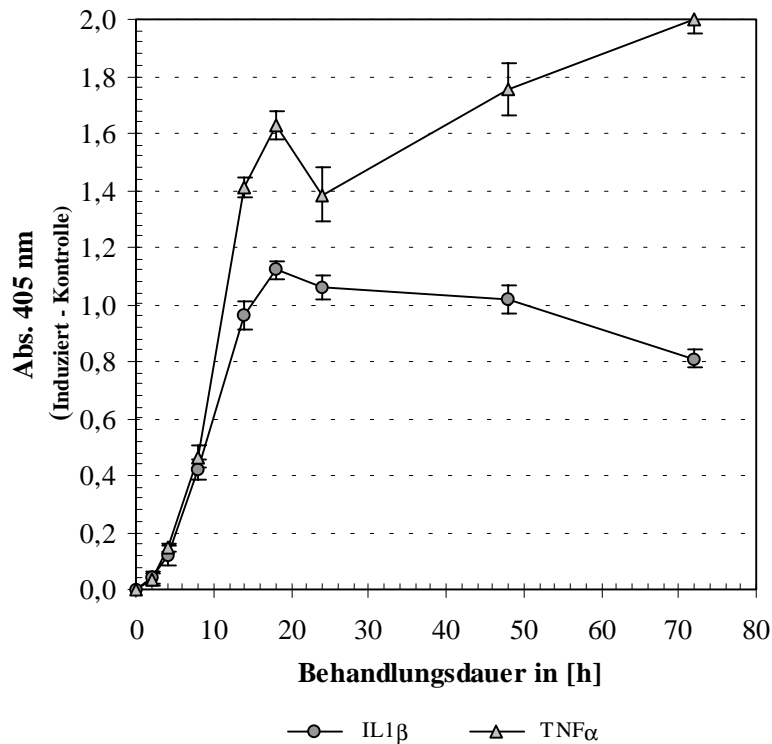


Abb. 9 : Zeitverlauf der Zytokin-verstärkten ICAM-1-Expression

CCF-STTG1-Zellen wurden mit 100 U IL1β/ml bzw. 50 ng TNFα/ml für 2, 4, 8, 14, 18, 24, 48 und 72 h behandelt und anschließend im ICAM-1-ELISA analysiert. Es wurde der Mittelwert aus jeweils 3 Meßwerten berechnet und der Mittelwert der Zytokin-aktivierten Zellen vom Mittelwert der Kontrollzellen (nicht behandelt) subtrahiert. Diese Daten waren in zwei weiteren Experimenten reproduzierbar.

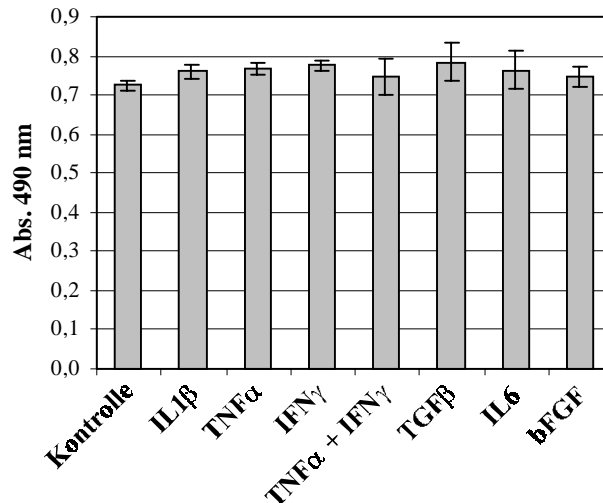
Eine maximale ICAM-1-Expression war durch die Behandlung der Zellen mit IL1β nach 18 h erreicht und zeigte ab diesem Zeitpunkt wieder eine langsame Verringerung der Expression. Die Behandlung der Zellen mit TNFα führte zu einer ersten maximalen ICAM-1-Expression nach 18 h und zeigte ab diesem Zeitpunkt eine Verringerung der Expression. Nach 24 h war durch die Behandlung mit TNFα ein zweiter Anstieg der ICAM-1-Expression zu beobachten, der nach 72 h noch nicht beendet war.

4.1.6. Astrozytäre ICAM-1-Expression unter Einfluß verschiedener Mitogene

Um zu untersuchen, inwieweit neben TNFα und IL1β weitere Mitogene die Fähigkeit besitzen, astrozytäres ICAM-1 zu verstärken, wurden die beiden astrozytären Zelllinien CCF-STTG1 und H4 mit verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren behandelt, die für die Alzheimer-Pathogenese von Bedeutung sind. Zu diesem Zweck wurden CCF-STTG1- und H4-Zellen bis zur Konfluenz in Mikrotiterplatten kultiviert und nach einem Mediumwechsel mit 100 U IL1β/ml, 50 ng TNFα/ml, 100 U IFNγ/ml, IFNγ mit TNFα, 200 U IL6/ml, 10 ng bFGF/ml und 2 ng TGFβ/ml für 18 h behandelt (siehe 3.3.10.) und anschließend die ICAM-1-Expression im ELISA gemessen (siehe 3.4.16.). Um zu untersuchen, inwieweit die Substanzen einen Einfluß auf die Wachstumsverhalten der Zellen ausüben, wurde nach der Behandlungszeit ein MTS-Test zur

Bestimmung der Lebendzellzahl durchgeführt (siehe 3.3.8.). Die Meßdaten dieser Analyse sind in Abb.10 und 11 graphisch dargestellt.

(1) MTS-Test



(2) ICAM-1-ELISA

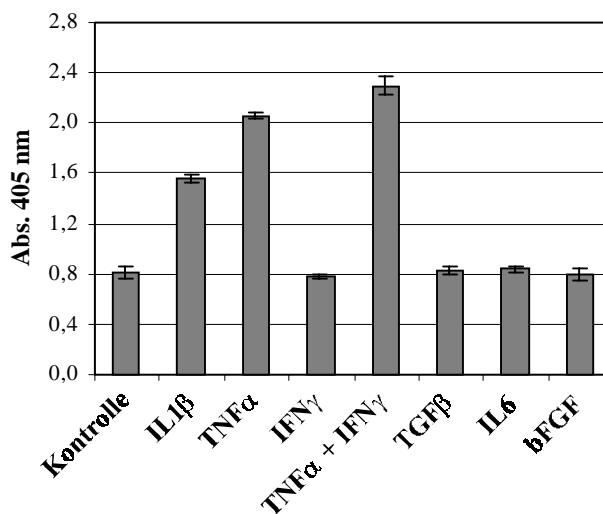


Abb. 10 : Einfluß verschiedener Mitogene auf die Expression des ICAM-1 in CCF-STTG1-Zellen

CCF-STTG1-Zellen wurden mit 100 U IL1β/ml, 50 ng TNFα/ml, 100 U IFNγ/ml, 50 ng TNFα/ml mit 100 U IFNγ/ml, 200 U IL6/ml, 10 ng bFGF/ml oder 2 ng TGFβ/ml für 18 h behandelt und anschließend im MTS-Test (1) und ICAM-1-ELISA (2) analysiert. Es wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten gebildet und die Standardabweichung errechnet.

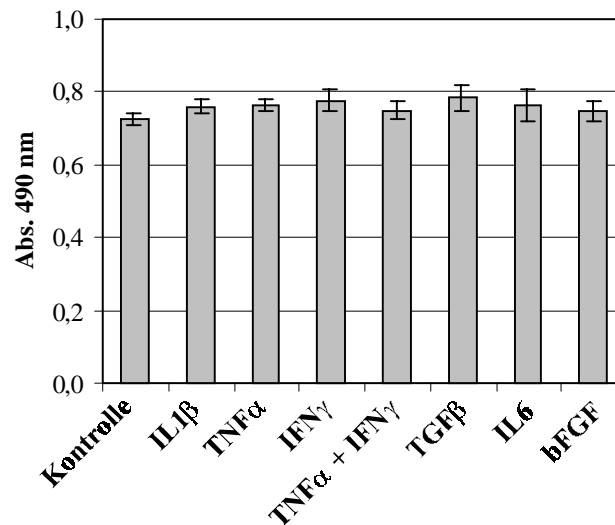
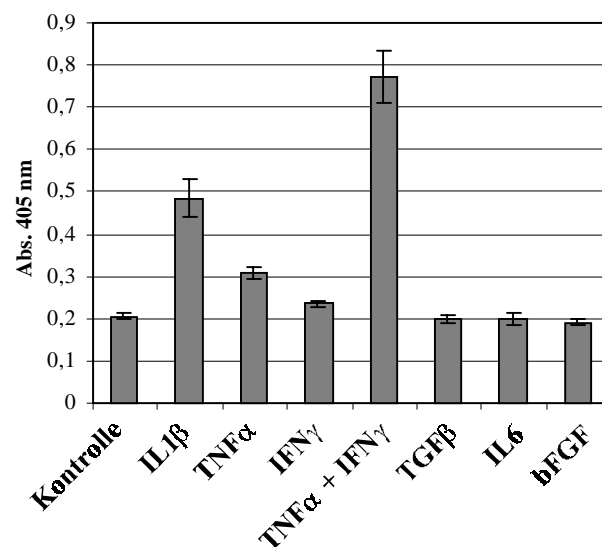
(1) MTS-Test**(2) ICAM-1-ELISA**

Abb. 11 : Einfluß verschiedener Mitogene auf die Expression des ICAM-1 in H4-Zellen

H4-Zellen wurden mit 100 U IL1β/ml, 50 ng TNFα/ml, 100 U IFNγ/ml, 50 ng TNFα/ml mit 100 U IFNγ/ml, 200 U IL6/ml, 10 ng bFGF/ml oder 2 ng TGFβ/ml für 18 h behandelt und anschließend im MTS-Test (1) und ICAM-1-ELISA (2) analysiert. Es wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten gebildet und die Standardabweichung errechnet.

Das Wachstumsverhalten der Zellen wurde durch Behandlung mit den Zytokinen und Wachstumsfaktoren geringfügig beeinflusst (siehe Abb. 10-1, 11-1). Dagegen wurde die Expression von ICAM-1 zum Teil stark verändert (siehe Abb. 10-2, 11-2). Wiederum zeigten IL1β und TNFα eine starke Stimulation der ICAM-1-Expression um den Faktor 1,9 bzw. 2,5, jedoch war die stärkste Stimulation durch die kombinierte Gabe von TNFα und IFNγ (Faktor 2,8)

zu beobachten. Alle anderen Mitogene zeigten nur einen geringen Einfluß auf die Expression von ICAM-1. Die Behandlung von H4-Zellen mit den o.g. Zytokinen und Wachstumsfaktoren führte zu einer ähnlichen Stimulation von ICAM-1 (siehe Abb. 11).

4.1.7. Astrozytäre ICAM-1-Expression unter Einfluß von physiologischem A β -Protein

Um zu überprüfen, ob die astrozytäre ICAM-1-Expression durch amyloidogene Ablagerungen verursacht oder verstärkt werden kann, wurden humane Astrozytom-Zellen (CCF-STTG1) mit konditionierten Medien von Neuroblastom-Zellen (Sy5y) behandelt, die in hohen Mengen A β -Protein in den Medienüberstand sekretieren. Im Vergleich zu Sy5y-Zellen, die stabil mit pCEP4/APP751 transfiziert sind, kann die stärkste A β -Sekretion in Sy5y-Zellen beobachtet werden, die stabil mit pCEP4/APP751sw (sw, schwedische Mutation) transfiziert sind ([Urmoneit, 1996](#)). Im konditioniertem Medium von Sy5y-Wildtypzellen ließ sich unter den verwendeten experimentellen Bedingungen kein A β nachweisen (siehe Ergebnisse, 4.2.5.).

CCF-STTG1-Zellen wurden in Mikrotiterplatten bis zur Konfluenz kultiviert und nach einem Mediumwechsel (Kultivierungsmedium für Sy5y-Zellen) mit 100 U IL1 β /ml, 50 ng TNF α /ml und 50 ng TNF α /ml mit 100 U IFN γ /ml sowie kombiniert mit konditionierten Medien von Sy5y-Wildtypzellen und stabil transfizierten Sy5y/APP751- und Sy5y/APP751sw-Zellen (1:2 verdünnt) behandelt. Nach 19 h wurde das Wachstumsverhalten der Zellen im MTS-Test und die ICAM-1-Expression im ELISA analysiert. Die Meßdaten sind in Abb. 12 dargestellt.

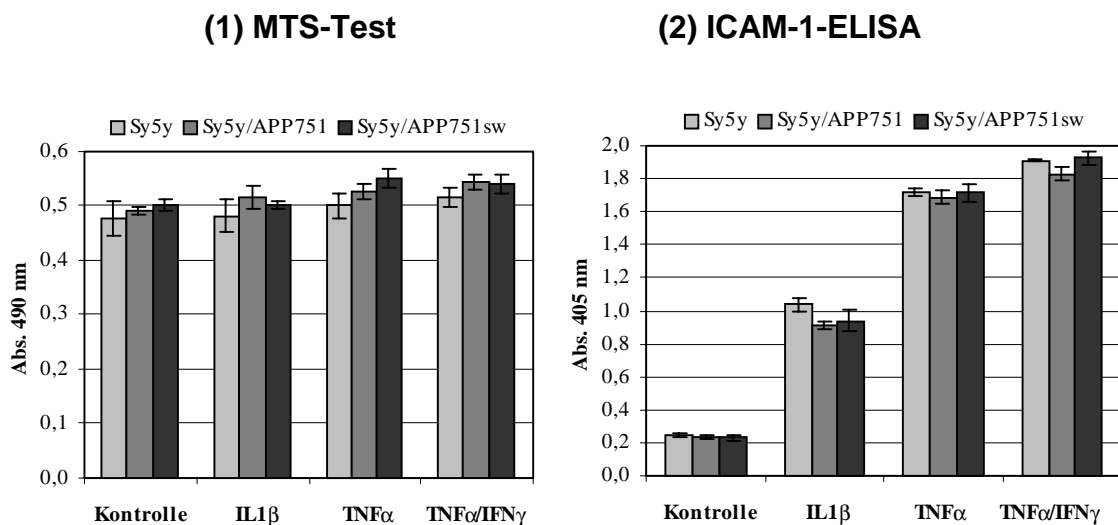


Abb. 12 : Einfluß des A β -Proteins auf die astrozytäre ICAM-1-Expression

CCF-STTG1-Zellen wurden mit 100 U IL1 β /ml, 50 ng TNF α /ml oder 50 ng TNF α /ml und 100 U IFN γ /ml in Kombination mit konditionierten Medien von Sy5y-, Sy5y/APP751- und Sy5y/APP751sw-Zellen für 19 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen im MTS-Test (1) und ICAM-1-ELISA (2) analysiert. Im Diagramm ist der Mittelwert aus jeweils vier Meßwerten und die daraus resultierende Standardabweichung dargestellt.

Weder das Wachstumsverhalten (siehe Abb. 12-1) noch die ICAM-1-Expression (siehe Abb. 12-2) der CCF-STTG1-Zellen wurden signifikant durch physiologisches A β -Protein aus konditionierten Medienüberständen von Sy5y-, Sy5y/APP751- und Sy5y/APP751sw-Zellen verändert. Auch durch weitere Experimente, in denen die astrozytäre ICAM-1-Expression durch

aggregiertes A β -Protein (Schering AG, Berlin) beeinflusst werden sollte (ohne Abb.), konnte kein direkter Zusammenhang zwischen amyloidogenen Ablagerungen und astrozytärer ICAM-1-Expression beobachtet werden.

4.1.8. Astrozytäre ICAM-1-Expression unter Einfluß konditionierter Medienüberstände aktivierter Mikroglia

Wie aus vorangegangenen Experimenten hervorgeht, besitzt A β -Protein keinen signifikanten Einfluß auf die astrozytäre ICAM-1-Expression. Amyloidogene Ablagerungen im Hirn von Alzheimer-Patienten weisen neben aktivierten Astrozyten auch eine starke Assoziation mit aktivierten Mikroglia auf. Verschiedene Forschungsgruppen konnten zeigen, daß Mikroglia durch aggregiertes A β , nicht jedoch durch monomeres A β stark aktiviert werden können ([Meda et al., 1995](#); [Lorton, 1997](#)). Die durch A β -Protein aktivierten Mikroglia sekretieren zahlreiche Zytokine, die die astrozytäre Aktivität beeinflussen könnten. Um zu überprüfen, inwieweit die astrozytäre ICAM-1-Expression eine Folgereaktion der A β -induzierten Mikroglia-Aktivität sein könnte, wurden humane Astrozytom-Zellen unter Einfluß konditionierter Medienüberstände A β -aktivierter Mikroglia auf ICAM-1-Expression analysiert. Die Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit 100 U IL1 β /ml, 50 ng TNF α /ml oder mit konditionierten Medienüberständen unbehandelter bzw. A β -aktivierter Mikroglia (1:2) für 18 h behandelt (die Medienüberstände wurden freundlicherweise von Dr. U. Mönning zur Verfügung gestellt). Mikroglia wurden aus dem Gesamthirn der Ratte (P3) isoliert und für 2 bis 5 Tage in Gegenwart von monomerem A β (1-42) bzw. aggregiertem A β (1-42) kultiviert. Die konditionierten Medienüberstände wurden gesammelt und bei -20°C gelagert. Die Analyse der ICAM-1-Expression erfolgte im ICAM-1-ELISA.

Wie aus Abb. 13 ersichtlich ist, verstärkten konditionierte Medienüberstände A β -aktivierter Mikroglia die ICAM-1-Expression humaner Astrozytom-Zellen. Eine mit den Zytokinen IL1 β oder TNF α vergleichbare Stimulation der ICAM-1-Expression wurde durch Behandlung der Astrozyten mit Medienüberständen von Mikroglia erreicht, die mit aggregiertem A β (1-42) behandelt wurden. Konditioniertes Medium von Mikroglia, die mit monomerem A β -Protein behandelt wurden, verstärkten nur leicht die astrozytäre ICAM-1-Expression. Diese Daten weisen darauf hin, daß die astrozytäre ICAM-1-Expression eine Folgereaktion mikroglialer Aktivierung ist.

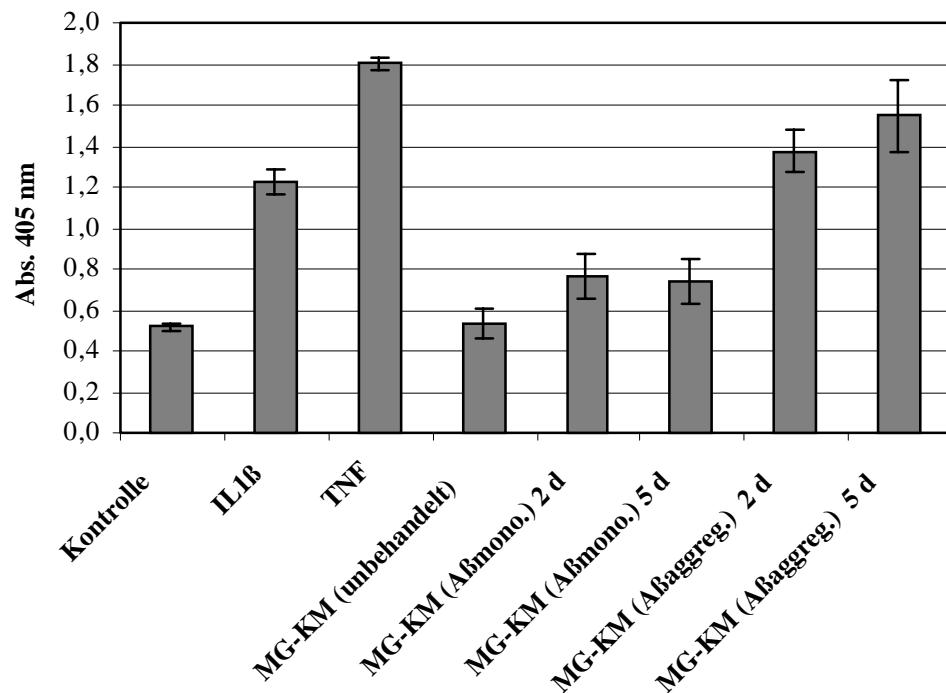


Abb. 13 : Einfluß konditionierter Medienüberstände aktivierter Mikroglia auf die astrozytäre ICAM-1-Expression

CCF-STTG1-Zellen wurden mit 100 U IL1 β /ml, 50 ng TNF α /ml (TNF) oder mit konditionierten Medienüberständen von Mikroglia (MG-KM) für 18 h behandelt und im ICAM-1-ELISA analysiert. Primäre Mikroglia wurden unbehandelt für 2 Tage kultiviert oder mit monomerem A β (1-42) (A β mono.) bzw. mit aggregiertem A β (1-42) (A β aggreg.) für 2 und 5 Tage kultiviert. Im Diagramm ist der Mittelwert aus jeweils 6 Meßwerten und die daraus resultierende Standardabweichung dargestellt. Diese Daten waren in drei weiteren Experimenten reproduzierbar.

4.1.9. Pharmakologische Beeinflussung der astrozytären ICAM-1-Expression

Astrozyten können die Alzheimer-Pathogenese erheblich verstärken, da sie im aktivierten Zustand zahlreiche Amyloidogenese-fördernde Substanzen sekretieren (z.B. α -1-Antichymotrypsin, Apolipoprotein, Komplement-Faktoren). Für das veränderte Proteinexpressionsmuster aktivierter Astrozyten sind Signaltransduktionswege verantwortlich, die durch IL1 β oder TNF α innerhalb einer Neuroinflammation ausgelöst werden können. Um den Signaltransduktionsweg der Astrozyten-Aktivierung näher zu charakterisieren, der zur verstärkten ICAM-1-Expression führt, wurden verschiedene pharmakologische Substanzen eingesetzt, die die Aktivität verschiedener Enzyme beeinflussen (siehe Tab. 5).

In einem ersten Experiment wurden humane Astrozytom-Zellen (CCF-STTG1), die in Mikrotiterplatten bis zur Konfluenz kultiviert wurden, zunächst mit den Zytokinen IL1 β oder TNF α für 18 h stimuliert und anschließend mit den in Tab. 5 aufgeführten Substanzen für weitere 18 h behandelt. Die darauffolgende Messung der ICAM-1-Expression im ICAM-1-ELISA zeigte keine Hemmung der IL1 β - und TNF α -Stimulation (ohne Abb.). In dem darauffolgenden Experiment wurde versucht, die astrozytäre ICAM-1-Expression durch Vorbehandlung mit den Signaltransduktionswegen-beeinflussenden Substanzen zu hemmen. Zu diesem Zweck wurden humane Astrozytom-Zellen für 1 h mit den pharmakologischen Substanzen vorbehandelt und anschließend für weitere 18 h mit 100 U IL1 β /ml bzw. 50 ng

TNF α /ml aktiviert. Für die quantitative Auswertung der ICAM-1-Hemmung durch diese Substanzen wurde eine Vitalitätsbestimmung (MTS-Test) durchgeführt (siehe 3.3.8.). Die Analyse der ICAM-1-Expression erfolgte im ICAM-1-ELISA.

Tab. 5 : Übersicht der verwendeten Hemmstoffe und Aktivatoren von Enzymen

	Substanz	Wirkung	Konzentration
Protein-kinasen-Hemmstoffe	K-252a	Serin-/Threonin-Kinasen-Hemmstoff : ↓ cAMP- und cGMP-abh. PK (Ki=18-20 nM) ↓ MLCK (Ki = 17 nM) ↓ PKX (Ki = 25 nM)	50 nM
	Herbimycin A	Protein-Tyrosin-Kinase-Hemmstoff	100 nM
	Bisindolylmaleimid	↓ PKC-Hemmstoff (Ki = 10 nM)	10 nM
	H-89, Dihydrochlorid	↓ PKA (Ki = 48 nM)	50 nM
	KT5823	↓ PKG (Ki = 234 nM)	250 nM
	KT5926	allgemeiner Kinasen-Hemmstoff : ↓ CaM Kinase II (Ki = 4,4 nM) ↓ MLCK (Ki = 18 nM)	20 nM
Enzym-Hemmstoffe	Wortmannin	irreversibler Hemmstoff der PI3-Kinase (IC50 = 5 nM)	10 nM
	Rolipram	↓ cAMP-spezifische Phosphodiesterase IV (IC50 = 1 μ M)	1 μ M
Enzym-aktivatoren	Forskolin	aktiviert die Adenylatzyklase	10 μ M

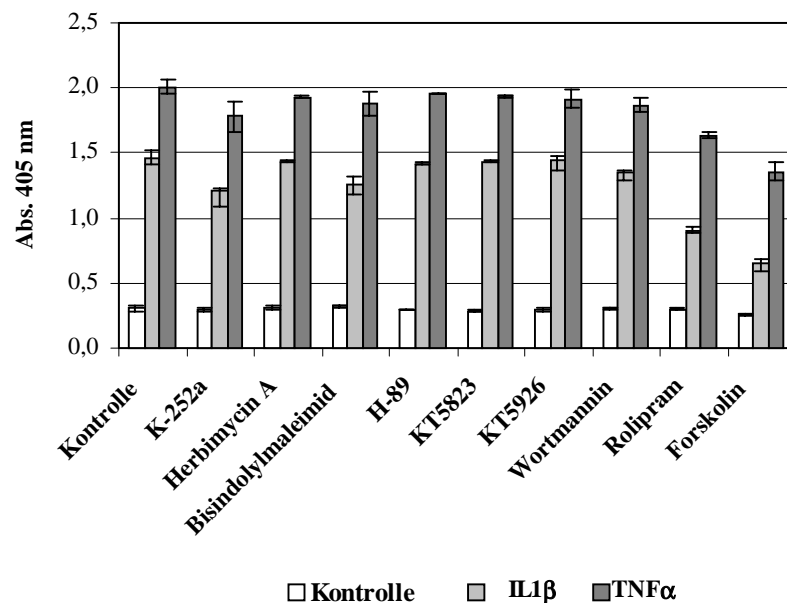
Die Proteinkinase-Hemmstoffe K-252a und Bisindolylmaleimid sowie der Phosphodiesterase-Hemmstoff Rolipram beeinflussten geringfügig das Wachstumsverhalten der Zellen (ohne Abb.). Im Gegensatz dazu zeigten sich große Unterschiede in der ICAM-1-Expression (siehe Abb. 14-1). Die Vorbehandlung der Zellen mit K-252a, Rolipram und Forskolin führte zu einer deutlichen Verringerung der ICAM-1-Expression nach Behandlung der Zellen mit den Zytokinen IL1 β oder TNF α . Die prozentuale Hemmung der Zytokin-verstärkten ICAM-1-Expression wurde nach folgender Formel berechnet :

$$Hemmung[\%] = \left(1 - \left(\frac{Abs.Hemmstoff - Abs.unbehandelt}{Abs.Zytokin - Abs.unbehandelt} \right) \right) \times 100$$

Für die Berechnung der prozentualen Hemmung der ICAM-1-Expression wurden die Meßwerte des ICAM-1-ELISA's mit den Meßwerten des MTS-Tests normalisiert.

(1)

ICAM-1-ELISA



(2)

Hemmung der ICAM-1-Expression

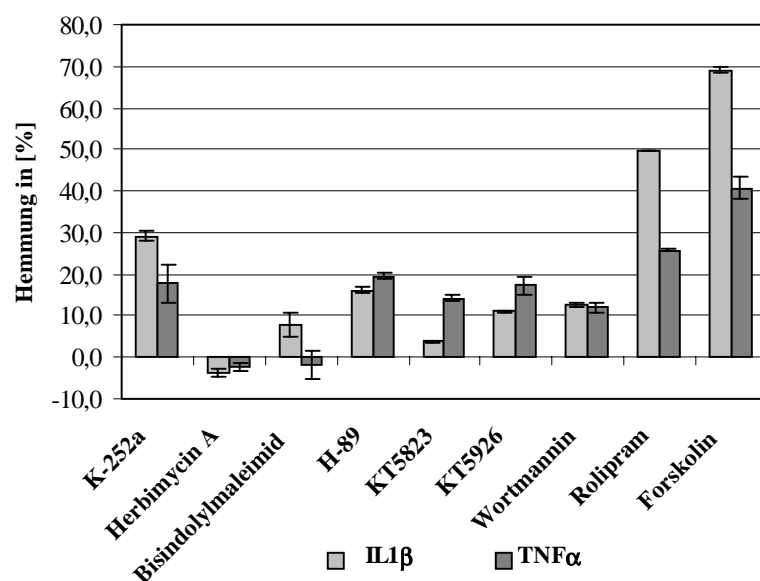


Abb. 14 : Einfluß von Enzym-Hemmstoffen auf die astrozytäre ICAM-1-Expression

(1) CCF-STTG1-Zellen wurden für 1 h mit den o.g. pharmakologischen Substanzen inkubiert, für 18 h mit 100 U IL1β/ml oder 50 ng TNFα/ml behandelt und im ICAM-1-ELISA analysiert. Es wurde der Mittelwert aus jeweils drei unabhängigen Experimenten und die daraus resultierende Standardabweichung ermittelt. (2) Es wurde die prozentuale Hemmung der Zytokin-stimulierten ICAM-1-Expression berechnet. Die angegebenen Werte repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie aus Abb. 14-1 hervorgeht, beeinflussen cAMP-erhöhende Substanzen besonders stark die astrozytäre ICAM-1-Expression. Die stärksten Effekte zeigten Forskolin und Rolipram. Forskolin verhinderte zu 69 %, Rolipram zu 50 % die astrozytäre ICAM-1-Expression nach Behandlung der Zellen mit IL1 β (siehe Abb. 14-2). Die Hemmung der ICAM-1-Expression nach Behandlung der Zellen mit TNF α zeigte ähnliche Ergebnisse, wobei die Verringerung der IL1 β -verstärkten ICAM-1-Expression deutlich stärker war. Forskolin bewirkt eine Aktivierung der Adenylatzyklase, die die Synthese von cAMP aus ATP katalysiert, wodurch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration ausgelöst wird. Rolipram hemmt die Aktivität der cAMP-spezifischen Phosphodi-esterase IV, die cAMP zu inaktivem AMP hydrolysiert und bewirkt damit ebenfalls eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die Substanz K-252a, die durch Hemmung cAMP-abhängiger Proteinkinasen die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht, verringerte die ICAM-1-Expression um 29 %.

Aus den dargestellten Ergebnissen geht hervor, daß pharmakologische Substanzen, die die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen, die astrozytäre ICAM-1-Expression vermindern, nicht aber eine schon bestehende Astrozyten-Aktivität beeinträchtigen.

4.1.10. Physiologische Beeinflussung der astrozytären ICAM-1-Expression

Durch Zellkulturexperimente konnte gezeigt werden, daß die astrozytäre ICAM-1-Expression durch Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration beeinflusst werden kann. Es ist vorstellbar, daß *in vivo* die astrozytäre ICAM-1-Expression ebenfalls über die Regulation der cAMP-Konzentration moduliert werden kann. Da von bestimmten Prostaglandin-Rezeptoren bekannt ist, daß sie mit cAMP-assoziierten Signaltransduktionswegen gekoppelt sind ([Coleman et al., 1994](#)), kämen Liganden der entsprechenden Prostaglandin-Rezeptoren, die Prostaglandine PGD₂ und PGE₂, als mögliche physiologische Modulatoren der astrozytären ICAM-1-Expression in Betracht. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden verschiedene Prostaglandine in ihrer Wirkung auf die astrozytäre ICAM-1-Expression untersucht.

Humane Astrozytom-Zellen wurden zunächst mit 1 μ M PGE₂ und 1 μ M PGD₂-Analoga für 1 h vorbehandelt und anschließend für 18 h mit 100 U IL1 β /ml oder 50 ng TNF α /ml aktiviert. Die Ergebnisse aus der Messung der Zellvitalität (MTS-Test) und ICAM-1-Expression (ICAM-1-ELISA) sind in Abb. 15 graphisch dargestellt.

Prostaglandine beeinflussten geringfügig das Wachstumsverhalten der Zellen (siehe Abb. 15-1), dagegen zeigten diese einen signifikanten Einfluß auf die ICAM-1-Expression (siehe Abb. 15-2). Prostaglandin E₂ (PGE₂) führte zu einer 68 %igen, PGD₂-Analoga zu einer 58 %igen Hemmung der ICAM-1-Expression nach Behandlung der Zellen mit IL1 β (siehe Abb. 15-3). Ebenso wie PGE₂ verminderte auch die PGD₂-analoge Substanz die TNF α -induzierte astrozytäre ICAM-1-Expression. Im Vergleich zu TNF α -behandelten Zellen war jedoch die Hemmung der ICAM-1-Expression in IL1 β -aktivierten Zellen deutlich stärker ausgeprägt. In einem vergleichbaren Experiment konnte eine zu PGE₂ vergleichbare Hemmung der astrozytären ICAM-1-Expression nach Behandlung mit Zytokinen mit PGE₁ beobachtet werden, dagegen zeigte PGF₂ α keinen Effekt (ohne Abb.).

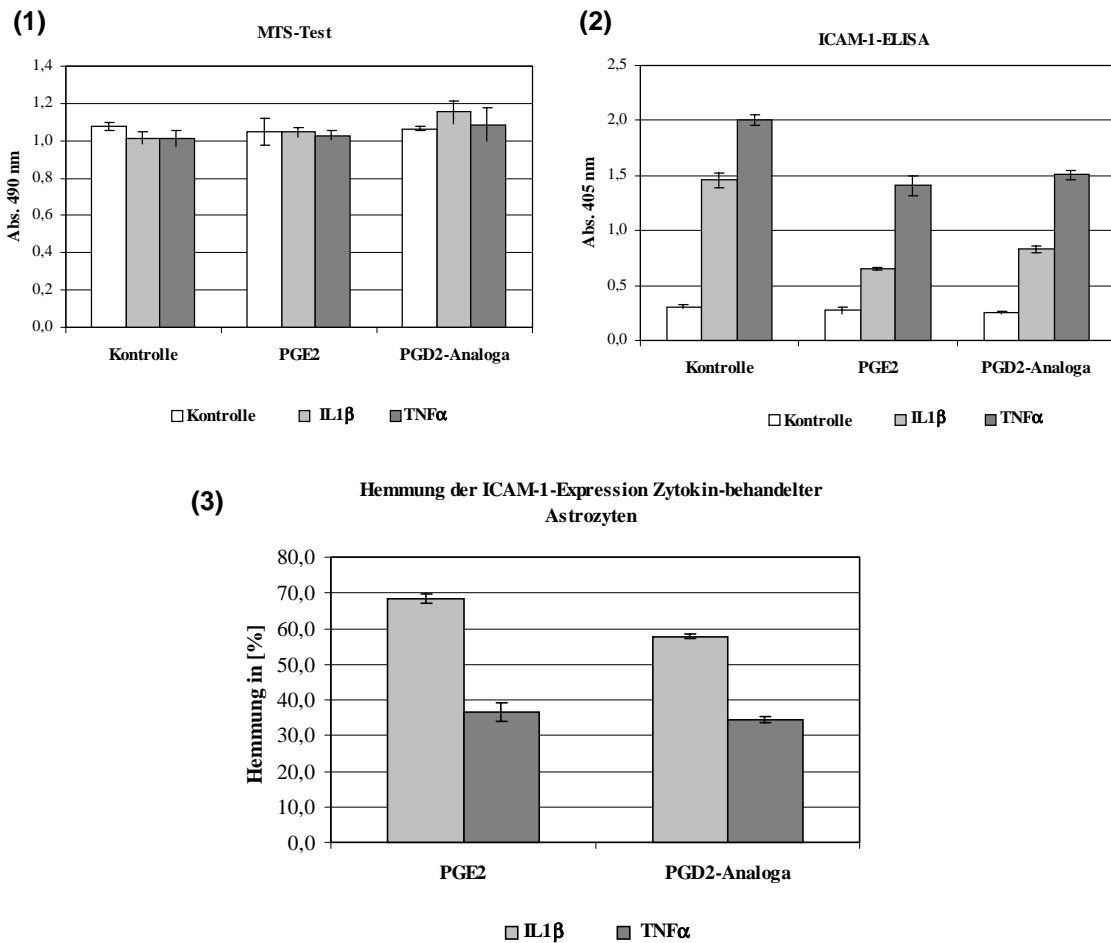


Abb. 15 : Einfluß von Prostaglandinen auf die astrozytäre ICAM-1-Expression

CCF-STTG1-Zellen wurden für 1 h mit 1 μ M PGE2 und 1 μ M PGD2-Analoga in Mikrotiterplatten behandelt und anschließend für 18 h mit 100 U IL1 β /ml bzw. 50 ng TNF α /ml stimuliert. Es wurden mit dem MTS-Test die Vitalität der Zellen (1) und mit dem ICAM-1-ELISA die ICAM-1-Expression (2) analysiert. Die angegebenen Werte repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. (3) Es wurde die prozentuale Hemmung der Zytokin-stimulierten ICAM-1-Expression berechnet (Formel siehe 4.1.9.). Hierfür wurden die Meßdaten des ICAM-1-ELISA's auf die Meßwerte des MTS-Tests normalisiert.

4.1.11. Astrozytäre Sekretion des Prostaglandin E2

Da in der Literatur beschrieben ist, daß Astrozyten in der Lage sind, Prostaglandine zu synthetisieren ([Fontana et al., 1982](#); [DuBois et al., 1986](#)), wurde untersucht, inwiefern die Zytokine IL1 β und TNF α im Vergleich zu konditionierten Medienüberständen aktivierter Mikroglia die astrozytäre PGE2-Sekretion beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden humane Astrozytom-Zellen (CCF-STTG1) mit 50 U IL1 β /ml, 10 ng TNF α /ml und konditioniertem Medium A β -aktivierter Mikroglia (Mikroglia wurden für 5 Tage mit aggregiertem A β behandelt; siehe Kap. 4.1.8.) für 5 Tage behandelt und die konditionierten Medienüberstände im PGE2-ELISA analysiert (siehe 3.4.15.).

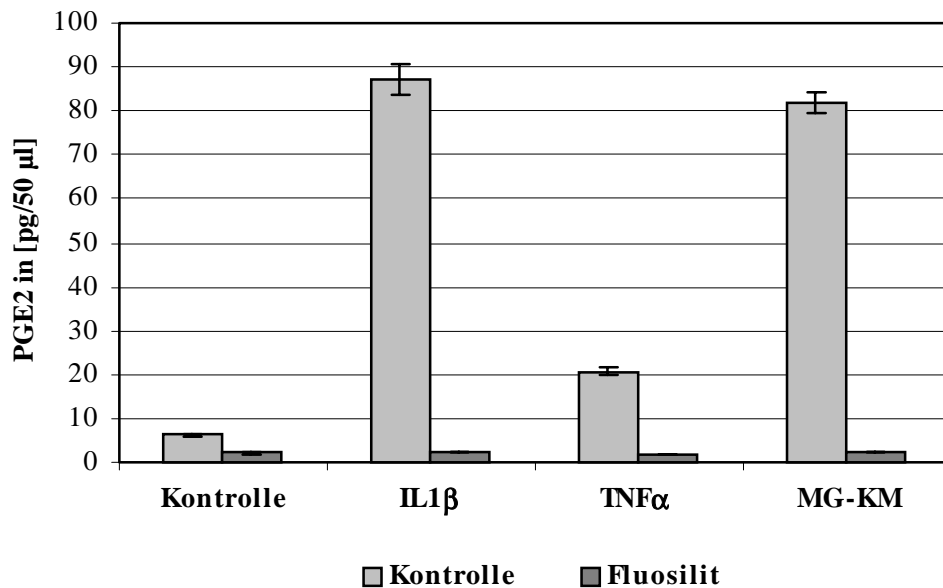


Abb. 16 : PGE2-Sekretion aktivierter Astrozyten

CCF-STTG1-Zellen wurden mit 50 U IL1β/ml, 10 ng TNFα/ml oder mit konditioniertem Medium Aβ-aktivierter Mikroglia (1:2, MG-KM) mit und ohne Cyclooxygenase-Hemmstoff Fluosilit für 5 Tage behandelt. Das konditionierte Medium der Zellen wurde im PGE2-ELISA analysiert. Die angegebenen Werte repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten und wurden anhand des jeweiligen mitgeführten PGE2-Standards (ohne Abb.) berechnet.

Wie in Abb. 16 deutlich zu sehen ist, verstärkten IL1β und konditioniertes Medium aktivierter Mikroglia die astrozytäre PGE2-Sekretion um das 13fache, TNFα um das 3fache. Zur Kontrolle der Spezifität des ELISA's wurde Fluosilit, ein Hemmstoff der Cyclooxygenase II (COXII), mitgeführt. Die Cyclooxygenase II ist ein Schlüsselenzym der Prostaglandin-Synthese. Die Behandlung der Zellen mit Fluosilit führte zu einer beinahe vollständigen Hemmung der verstärkten PGE2-Sekretion.

Diese Beobachtung läßt natürlich die Frage entstehen, warum die Astrozyten-Aktivität nicht durch die eigene Prostaglandin-Sekretion unterdrückt werden kann. Da eine Hemmung der ICAM-1-Expression nur durch Vorbehandlung mit Prostaglandinen erreicht werden konnte, läßt sich vermuten, daß Prostaglandine nur die Astrozyten-Aktivierung, nicht aber eine schon bestehende Aktivität vermindern können (siehe auch 4.1.9.). *In vivo* könnten Prostaglandine jedoch eine räumliche Ausbreitung der Astrozyten-Aktivierung verhindern.

4.2. Untersuchungen zur Expression und Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins APP in Astrozyten

4.2.1. Übersicht und Fragestellung

Der Hauptbestandteil seniler Plaques im Hirn von Alzheimer-Patienten ist das A β -Protein, das durch amyloidogene Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) entsteht (siehe Einleitung, 1.3.). Obwohl viele Daten darauf hinweisen, daß Neurone die Hauptproduzenten des A β -Proteins (A β) sind, ist bis heute noch nicht untersucht worden, inwieweit aktivierte Astrozyten zur Alzheimer-assoziierten Amyloidogenese beitragen. Das Ziel der im folgenden Kapitel beschriebenen Experimente bestand zum einen darin zu untersuchen, inwieweit Astrozyten im Vergleich zu Neuronen in der Lage sind, amyloidogene APP-Fragmente zu bilden, und zum anderen, welchen Einfluß Zytokine und Wachstumsfaktoren auf die amyloidogene APP-Prozessierung astrozytärer Zellen besitzen.

4.2.2. APP-Prozessierung in Astrozyten

Um die astrozytäre APP-Prozessierung zu untersuchen, wurden verschiedene Astrozyten-Zelllinien und primäre Astrozyten herangezogen. Als Vergleich dienten primäre neuronale Zellen sowie Hirngewebe der Ratte. Als Kontrolle für die elektrophoretische Mobilität der APP-Isoformen sowie proteolytischer APP-Fragmente wurden stabil transfizierte H4-Zellen eingesetzt, die die APP-cDNA mit der schwedischen Mutation exprimieren (H4/APP695sw, H4/APP751sw; siehe auch 4.2.6.).

Es wurden primäre Astrozyten aus dem Gesamthirn (siehe 3.3.1.) sowie primäre Neurone aus dem Cerebellum der Ratte (siehe 3.3.2.) isoliert. Für die biochemische Untersuchung des Hirngewebes wurde Rattenhirn (P3), wie in 3.4.1. beschrieben, lysiert. Primäre Astrozyten wurden am Tag 14 und primäre Neurone am Tag 8 nach der Isolierung geerntet und lysiert (siehe 3.4.2.). Die Lyse der astrozytären Zelllinien CCF-STTG1 und H4 sowie stabil transfizierter H4/APP695sw- und H4/APP751sw-Zellen erfolgte in der Zellkulturschale (siehe 3.4.2.). Die gelösten Proteine aus den Zellysaten wurden mit Aceton gefällt, in 8 M Harnstoff und Probenpuffer hitzedenaturiert (siehe 3.4.4.) und im 10 %igen Tris-/Tricin-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.4.9.). Das konditionierte Medium der Zellen wurde mit einem Antikörper immunpräzipitiert (siehe 3.4.6.), der sekretorisches APP erkennt (anti-FdAPP), und die hitzedenaturierten Immunpräzipitate gelelektrophoretisch aufgetrennt (7,5 % Tris/ Glycin-Gel, siehe 3.4.8.). Anschließend wurden die proteolytischen APP-Fragmente im Western-Blot mit folgenden primären Antikörpern über Chemolumineszenz (siehe 3.4.14.) nachgewiesen:

MAk 22C11 : erkennt alle postranslational modifizierten und nichtmodifizierten APP-Isoformen (APP, nichtmodifiziert; APP*, posttranslational modifiziert) in Zellysaten sowie sekretorisches APP im konditionierten Medium (*secAPP*)

anti-CT : erkennt Carboxy-terminale Fragmente, die nach α - und γ -Sekretase-aktivität (CT; nicht-amyloidogenes Fragment ohne vollständige A β -Sequenz) und nach β -Sekretaseaktivität (A4CT; amyloidogenes Fragment mit vollständiger A β -Sequenz) entstehen.

Ein repräsentatives Ergebnis der APP-Analyse ist in Abb. 17 dargestellt. In allen analysierten Zellen sind Amyloid-Vorläuferproteine im Molmassenbereich 95 bis 130 kDa nachweisbar (siehe Abb. 17B-1). Im Vergleich zu Neuronen-spezifischem APP sind in Astrozyten durch den Antikörper 22C11 Amyloid-Vorläuferproteine als Banden mit einer höheren Molmasse nachweisbar : Hauptbestandteil der Amyloid-Vorläufer-proteine in Astrozyten sind Formen mit einer Molmasse von ca. 103 und 130 kDa. In neuronalen Zellen sind Amyloid-Vorläuferformen

mit einer Molmasse von ca. 95 und 108 kDa nachweisbar. Der Vergleich mit Lysaten stabil transfizierter H4/APP751sw- und H4/APP695sw-Zellen führte zur Identifizierung der zelltypspezifisch-exprimierten APP-Isoformen: Astrozyten exprimierten vorwiegend APP751, Neurone APP695. Die Heterogenität der Amyloid-Vorläuferproteine ist eine Folge posttranslationaler Modifizierungen (siehe Einleitung, S.4) : Die in Astrozyten detektierte Bande mit einer Molmasse von 103 kDa entspricht nichtmodifiziertem APP751, dagegen handelt es sich bei der Bande mit einer Molmasse von 130 kDa um posttranslational modifiziertes APP751 (APP751*). Die in Neuronen detektierte Bande (95 kDa) wurde als nichtmodifiziertes APP695 identifiziert, die Bande mit höherer Molmasse (108 kDa) als posttranslational modifiziertes APP695 (APP695*).

Das amyloidogene Fragment A4CT war ausschließlich in primären Neuronen sowie im Lysat des Rattenhirns in signifikanten Mengen nachweisbar (siehe Abb.17B-1). Im Lysat primärer Astrozyten und humaner Astrozyten-Zelllinien konnte kein A4CT nachgewiesen werden. Nicht-amyloidogene C-terminale Fragmente waren in allen Zellen zu sehen, allerdings traten besonders bei astrozytären Zelllinien (CCF-STTG1, H4) zahlreiche C-terminale Fragmente auf. Die heterogene Vielfalt C-terminaler Fragmente astrozytärer Zellen konnte auch mit einem weiteren polyklonalen Antikörper (anti-APP/CT, Serotec) nachgewiesen werden (ohne Abb.).

Das zelltypspezifische APP-Expressionsmuster astrozytärer und neuronaler Zellen spiegelte sich auch in der Sekretion von APP in den Medienüberstand wider (siehe Abb. 17B-2). Es war deutlich zu erkennen, daß Zellen astrozytären Ursprungs verstärkt APP-Isoformen mit hoher Molmasse sekretieren (APP751), während primäre Neurone vorwiegend APP mit niedrigerer Molmasse ausschleusen (APP695). In konditionierten Medienüberständen primärer Astrozyten war kaum APP nachweisbar. In einem weiteren Experiment wurde mit Hilfe einer metabolischen Markierung der Zellen mit [³⁵S]-Methionin untersucht (siehe 3.3.7.), ob im konditionierten Medienüberstand primärer Neurone und primärer Astrozyten das Aβ-Protein mit dem polyklonalen Antikörper anti-Aβ(2-43) nachweisbar ist. Es konnte jedoch weder im Medium der Neurone noch im Medium der Astrozyten Aβ-Protein nachgewiesen werden (ohne Abb.).

Durch die vergleichende Analyse der astrozytären und neuronalen APP-Prozessierung konnte gezeigt werden, daß hauptsächlich Neurone signifikante Mengen des amyloidogenen Fragmentes A4CT bilden. Hingegen wiesen Astrozyten eine größere Heterogenität in der APP-Prozessierung zu nicht-amyloidogenen C-terminalen Fragmenten auf.

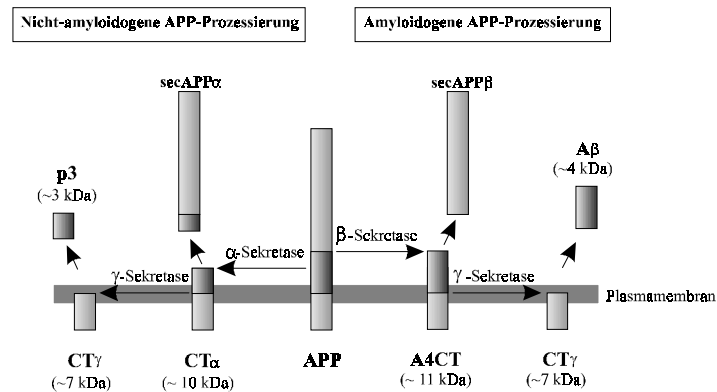
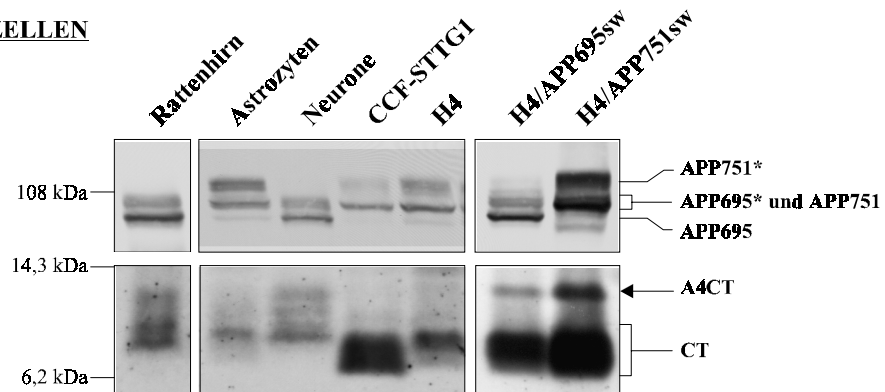
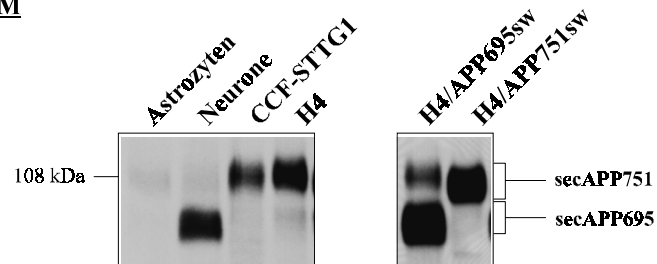
A**B****(1) ZELLEN****(2) MEDIUM**

Abb. 17 : Nachweis proteolytischer APP-Fragmente von Astrozyten und Neuronen

A. Darstellung der APP-Prozessierungswege, B. (1) Western-Blot gelelektrophoretisch aufgetrennter, mit Aceton gefällten Lysate von Rattenhirn, primären Astrozyten (Astrozyten), primären Neuronen (Neurone) und humanen astrozytären Zelllinien (CCF-STTG1-, H4-, H4/APP695sw-, H4/APP751sw-Zellen). Es wurden APP-Isoformen und proteolytische Fragmente der APP-Prozessierung nachgewiesen. C-terminale, nicht-amyloidogene Fragmente (CT) wurden mit polyspezifischem anti-CT, posttranslational modifizierte (APP*) und nichtposttranslational modifizierte (APP) APP-Isoformen mit MAK 22C11 nachgewiesen. (2) Sekretorisches APP (secAPP) wurde in immunpräzipitierten, konditionierten Medienüberständen nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Western-Blot mit MAK 22C11 nachgewiesen. Am linken Bildrand ist der Molmassenstandard angegeben.

4.2.3. Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen A β -Protein

Um die A β -Sekretion von Astrozyten untersuchen zu können, wurden monoklonale Antikörper gegen A β -Protein auf ihre Fähigkeit überprüft, A β (1-40) oder A β (1-42) aus Medienüberständen zu präzipitieren. Für diese Analyse wurden stabil transfizierte Sy5y/APP751sw-Zellen (sw, *schwedische Mutation*) eingesetzt, die A β -Protein in hohen Mengen in den Medienüberstand sekretieren (siehe auch 4.2.5.). Für die A β -Analyse war eine metabolische Markierung der Zellen mit [35 S]-Methionin notwendig (siehe 3.3.7.). Die monoklonalen Antikörper anti-A β (1-6), anti-A β (1-40) und anti-A β (1-42) wurden jeweils über anti-Maus-IgG an Protein A-Sepharose gekoppelt (siehe 3.4.7.) und für die Immunpräzipitation der Medienüberstände eingesetzt (siehe 3.4.5.). Nach elektrophoretischer Auftrennung der hitzedenaturierten Immunpräzipitate in einem 12 %igem Tris-/Bicin-/Harnstoff-Gel (siehe 3.4.11.) wurden die Proteine im Gel fixiert, das Gel getrocknet und anschließend auf einem Phosphorscreen exponiert. Die autoradiographische Analyse erfolgte mit Hilfe des Phosphorimagers (siehe 3.4.13.). Als Kontrolle für die elektrophoretische Mobilität der Peptide A β (1-40) und A β (1-42) wurden jeweils 0,5 μ g A β -Peptid (Fa. Bachem) eingesetzt und nach elektrophoretischer Auftrennung mit Coomassie Blue angefärbt (siehe 3.4.12.).

Die Autoradiographie ist in Abb. 18 dargestellt. Der monoklonale Antikörper anti-A β (1-6), der gegen den N-Terminus von A β gerichtet ist, präzipitierte sowohl A β (1-40) als auch A β (1-42). Die monoklonalen Antikörper anti-A β (1-40) und anti-A β (1-42) sind beide gegen den C-Terminus des A β gerichtet. Anti-A β (1-40) präzipitierte spezifisch A β (1-40) mit einer Molmasse von 6,5 kDa, während anti-A β (1-42) spezifisch A β (1-42) mit einer Molmasse von 5,5 kDa erkannte. Aus vergleichbaren Untersuchungen von Immunpräzipitaten, die im Gradientengel (6,5 bis 16,5 Tris/Tricin) oder in NuPAGE-Gelen (4-12 % Tris/Bicin) elektrophoretisch aufgetrennt wurden, ging hervor, daß der Antikörper anti-A β (1-6) sowohl A β als auch sekretorisches APP nach α -Sekretase-aktivität präzipitiert, und die monoklonalen Antikörper anti-A β (1-40) und anti-A β (1-42) neben A β auch das nicht-amyloidogene Fragment p3 präzipitieren (ohne Abb.).

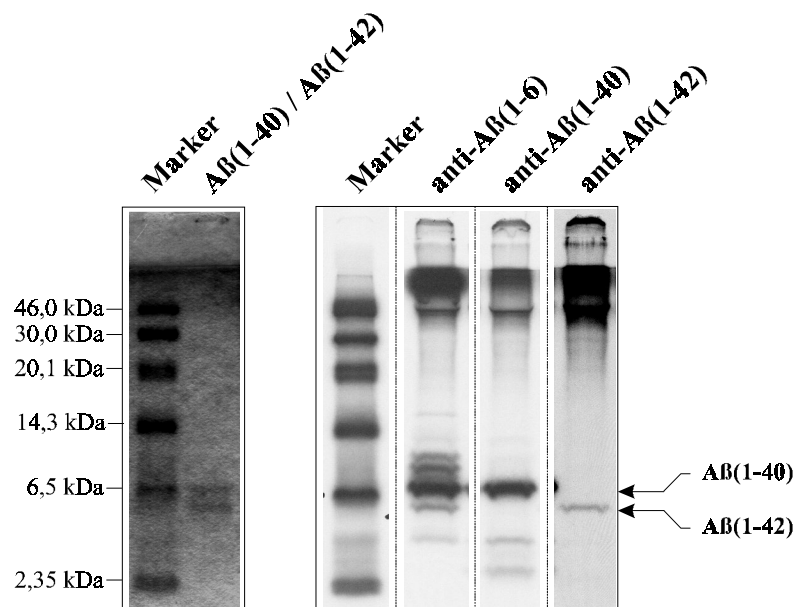


Abb. 18 : Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen A β -Protein

Autoradiographie gelelektrophoretisch aufgetrennter, mit den o.g. monoklonalen Antikörpern immunpräzipitierten, 35 S-markierten A β aus konditionierten Medienüberständen von Sy5y/APP751sw-Zellen. A β -Peptide (1-40) und (1-42) wurden über Coomassie Blue-Färbung detektiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Immunpräzipitate erfolgte in einem 12 %igen Tris-/Bicin-/Harnstoff-Gel. Am linken Bildrand ist der Molmassenstandard eingezeichnet (Marker).

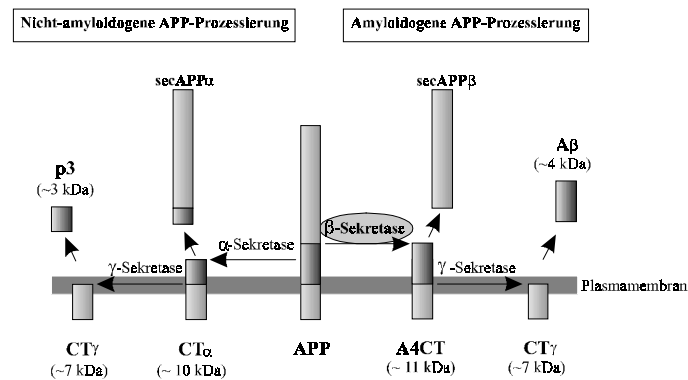
4.2.4. Nachweis der β -Sekretaseaktivität in transfizierten Astrozyten

Um die amyloidogene APP-Prozessierung in Astrozyten besser verfolgen und damit auch das amyloidogene Zwischenprodukt A4CT nachweisen zu können, das nach β -Sekretaseaktivität entsteht, wurden Astrozyten mit verschiedenen APP-cDNA transfiziert. Da bekannt ist, daß die schwedische Mutation, die N-terminal der β -Sekretaseschnittstelle lokalisiert ist (Aminosäureaustausch KM \rightarrow NL), zu einer verstärkten β -Sekretaseaktivität führt (siehe auch Einleitung, Kap. 1.2.), wurden die Zellen sowohl mit APP-cDNA als auch mit APPsw-cDNA (sw, schwedische Mutation) transfiziert.

CCF-STTG1- und H4-Zellen wurden, wie in 3.3.9. beschrieben, mit den Konstrukten pCEP4, pCEP4/APP695, pCEP4/APP751, pCEP4/APP695sw und pCEP4/APP751sw (siehe Material, Kap. 2.10.) transient transfiziert. Zum Vergleich wurden humane Neuroblastom-Zellen (Sy5y) und stabil transfizierte Sy5y/APP751- und Sy5y/APP751sw-Zellen herangezogen. Die Analyse der APP-Prozessierung erfolgte nach metabolischer Markierung für 6 h mit 200 μ Ci [35 S]-Methionin (siehe 3.3.7.). Danach wurden APP-Fragmente (A4CT, CT) mit polyklonalem anti-A4CT aus den Zellysaten immunpräzipitiert und nach elektrophoretischer Auftrennung im Gradientengel (6,5 – 16,5 % Tris/Tricin) in einer Autoradiographie nachgewiesen. Sekretorisches APP aus dem Medienüberstand wurde durch Immunpräzipitation mit polyklonalem anti-FdAPP vergleichbar zu den Lysatimmunpräzipitaten aufgearbeitet. Auf diese Weise konnten „*de novo*“-synthetisiertes APP und APP-Fragmente im Zellysat und konditioniertem Medium identifiziert werden.

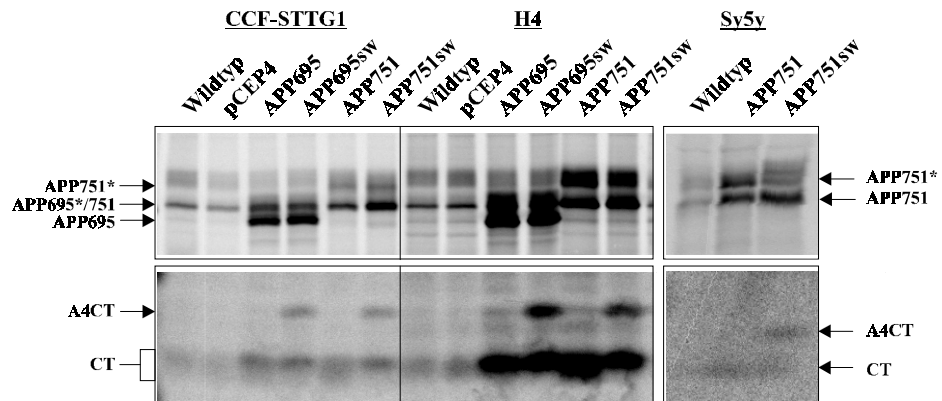
Anhand des Nachweises der APP-Isoformen im Zellysat und konditioniertem Medium konnte die Expression der transfizierten APP-cDNA in allen Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 19B-1, -2). Astrozytäre Zellen, die mit APP695- oder APP751-cDNA transfiziert waren, zeigten deutlich eine verstärkte Akkumulation C-terminaler Fragmente (CT, siehe Abb. 19B-1). Die Transfektion der Zellen mit APPsw-cDNA, die die schwedische Mutation enthielt (APP695sw, APP751sw), führte sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten zur Bildung von A4CT. A4CT ist ein Zwischenprodukt der amyloidogenen APP-Prozessierung und entsteht nach proteolytischer Aktivität der β -Sekretase (siehe Abb. 20A). Dieses Ergebnis konnte in drei weiteren Experimenten sowie mit transfizierten primären Astrozyten verifiziert werden (ohne Abb.).

A.



B.

(1) ZELLEN



(2) MEDIUM

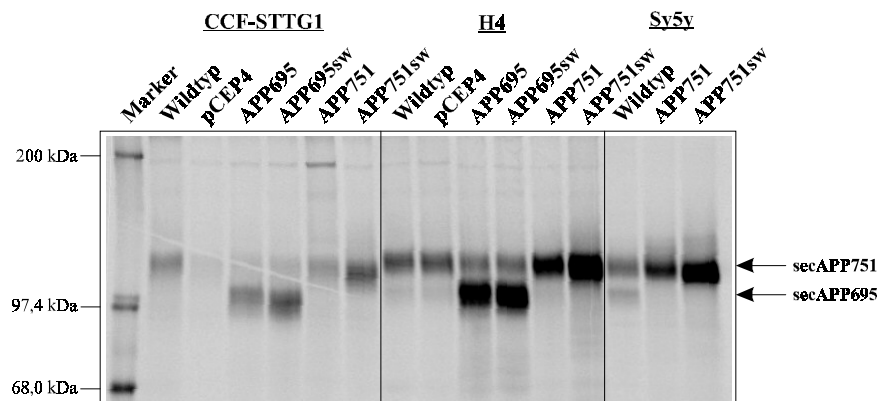


Abb. 19 : APP-Prozessierung transfizierter Astrozyten und Neurone

A. Darstellung der APP-Prozessierungswege, B. Autoradiographie astrozytärer Zellen (CCF-STTG1, H4) und Neuroblastom-Zellen (Sy5y), die mit den Konstrukten pCEP4, pCEP4/APP695 (APP695), pCEP4/APP695sw (APP695sw), pCEP4/APP751 (APP751) oder pCEP4/APP751sw (APP751sw) transfiziert wurden. Die [35 S]-Methionin markierten, anti-A4CT-immunpräzipitierten Zellsate (1) wurden im Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt, die anti-FdAPP-präzipitierten Medienüberstände (2) im 7,5 %igen Laemmli-Gel. Es wurde die gesamte Proteinmenge auf das Gel aufgetragen.

4.2.5. Nachweis der γ -Sekretaseaktivität in transfizierten Astrozyten

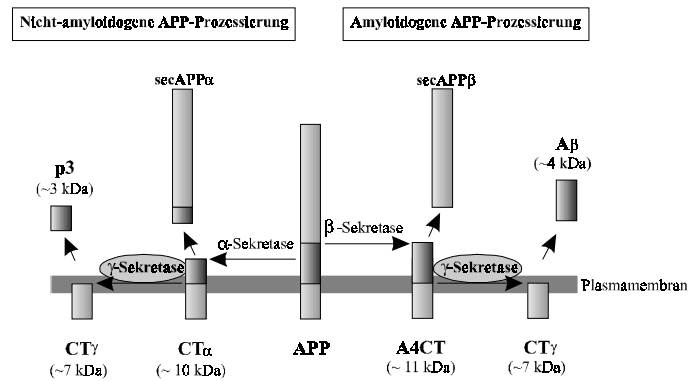
Nachdem gezeigt werden konnte, daß neben den Neuronen auch Astrozyten über eine β -Sekretaseaktivität verfügen (siehe 4.2.4.), sollte nun untersucht werden, inwiefern Astrozyten eine γ -Sekretaseaktivität aufweisen. Nur durch Aktivität der γ -Sekretase kann letztendlich lösliches A β -Protein entstehen (siehe Abb. 20A), das dann von den Zellen in den Medienüberstand sekretiert werden kann. Im Hinblick auf den C-Terminus des A β wurden unterschiedlich lange A β -Proteine publiziert ([Zhong et al., 1994](#); [Citron et al., 1996](#)), die als A β (1-40) und A β (1-42) bezeichnet werden. Die Aktivität der γ -Sekretase kann auch anhand des Fragmentes p3 nachgewiesen werden, das nach proteolytischer Aktivität der α -Sekretase und γ -Sekretase bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung entsteht (siehe Abb. 21A). Zum Nachweis von A β (1-40), A β (1-42) und p3 wurden die Medienüberstände der in Kap. 4.2.4. beschriebenen transfizierten Zellen (CCF-STTG1-, H4- und Sy5y-Zellen) mit den monoklonalen Antikörpern anti-A β (1-40) und anti-A β (1-42) immunpräzipitiert. Hierfür wurden die monoklonalen Antikörper zuvor über anti-Maus-IgG an Protein A-Sepharose gekoppelt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der gesamten Proteinmenge der Immunpräzipitate erfolgte die Analyse der APP-Fragmente mittels Autoradiographie.

Wie aus Abb. 20B-1 ersichtlich ist, sind sowohl transfizierte als auch nicht-transfizierte astrozytäre Zellen in der Lage, signifikante Mengen A β (1-40) zu bilden. Hingegen konnte in konditioniertem Medium von Wildtyp-Neuroblastom-Zellen (Sy5y) kein A β (1-40) nachgewiesen werden.

Die Expression von APP695- oder APP751-cDNA führte in CCF-STTG1- und H4-Zellen zu einer verstärkten Sekretion des p3-Fragmentes. Alle Zellen, die mit APP695sw- bzw. APP751sw-cDNA transfiziert waren, zeigten eine verstärkte Sekretion des A β (1-40), während die Sekretion des nicht-amyloidogenen Fragmentes p3 leicht abnahm.

Die Analyse der A β (1-42)-Sekretion zeigte (siehe Abb. 20B-2), daß geringe Mengen A β (1-42) ausschließlich in konditionierten Medienüberständen von H4- und Sy5y-Zellen nachweisbar waren, die die APP-cDNA mit der schwedischen Mutation exprimierten (APP695sw, APP751sw). Das nicht amyloidogene Fragment p3 konnte mit anti-A β (1-42) hier nicht gezeigt werden. Diese Befunde konnten in drei weiteren Experimenten reproduziert werden.

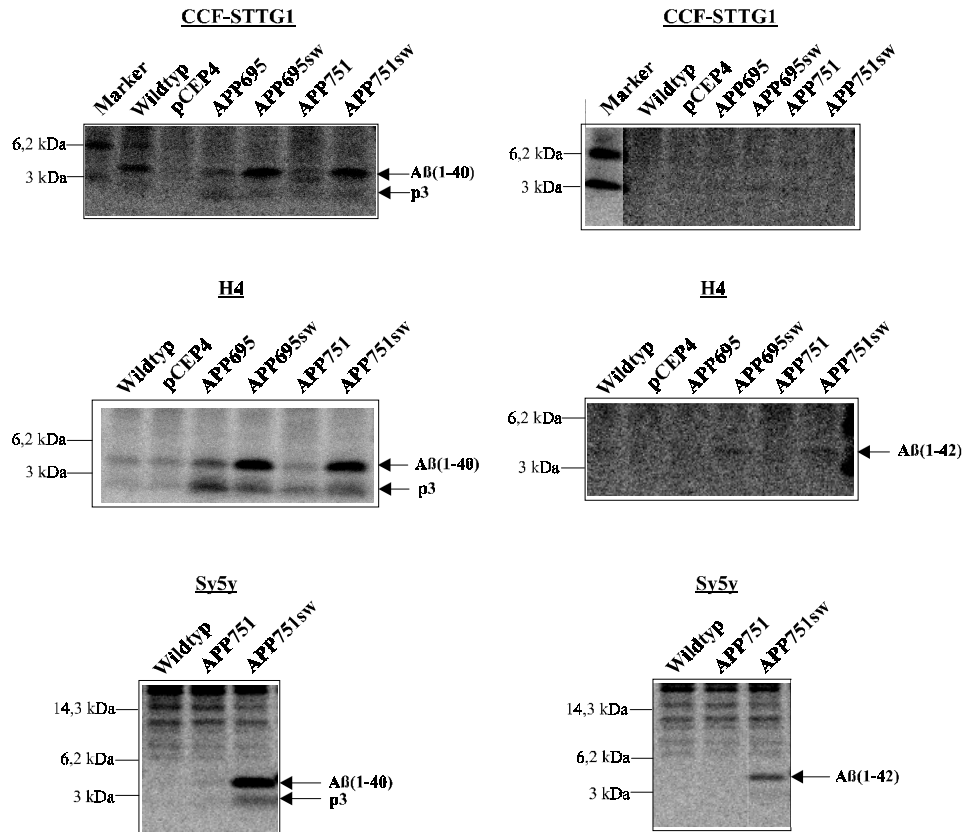
A.



B.

(1)

(2)

A β (1-40)-SEKRETIONA β (1-42)-SEKRETIONAbb. 20 : A β -Sekretion transfizierter Astrozyten und Neuronen

A. Darstellung der APP-Prozessierungswege, B. Autoradiographie von metabolisch mit [35 S]-Methionin markierten, mit (1) anti-A β (1-40) und (2) anti-A β (1-42) immunpräzipitierten Medienüberständen astrozytärer Zellen (CCF-STTG1, H4) und Neuroblastom-Zellen (Sy5y), die mit den Konstrukten pCEP4, pCEP4/APP695 (APP695), pCEP4/APP695sw (APP695sw), pCEP4/APP751 (APP751) oder pCEP4/APP751sw (APP751sw) transfiziert wurden. Die elektrophoretische Auftrennung der Immunpräzipitate erfolgte in NuPage-Gelen (4-12 % Tris/Bicin).

Um zu verdeutlichen, daß sich das Verhältnis $A\beta(1-40)$ zu p3 nach Expression der verschiedenen APP-cDNA unterschiedlich änderte, wurden die Autoradiographien einer densitometrischen Analyse mit der Software ImageQuant unterzogen. Es wurde das Verhältnis $A\beta(1-40)$ zu p3 berechnet und graphisch in Abb. 21 dargestellt.

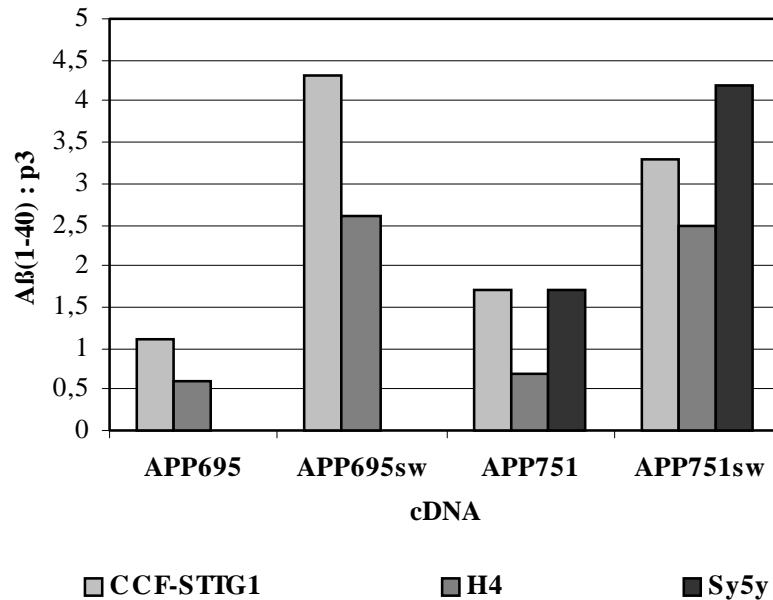


Abb. 21 : Verhältnis $[A\beta(1-40):p3]$ transfizierter Astrozyten und Neuronen

Das Diagramm zeigt das Verhältnis $[A\beta(1-40):p3]$, das nach densitometrischer Auswertung der Autoradiographie (Abb. 20B-1) mit densitometrischen Meßeinheiten, die mit den Meßwerten der radioaktiven Einbaurate normalisiert wurden, berechnet wurde. CCF-STTG1-, H4- und Sy5y-Zellen wurden mit den o.g. APP-cDNA transfiziert.

Im Vergleich zu APP-cDNA-exprimierenden Zellen führte die Expression der APPsw-cDNA, die in ihrer Sequenz die schwedische Mutation enthält (APP695sw, APP751sw) zu einem erhöhten Verhältnis $[A\beta(1-40):p3]$. Desweiteren war auffällig, daß sich das Verhältnis $[A\beta(1-40):p3]$ astrozytärer Zellen in Abhängigkeit von der überexprimierten APP-Isoform veränderte. Astrozyten, die mit der APP695sw-cDNA transfiziert waren, sekretierten bedeutend mehr $A\beta(1-40)$ als Zellen, die mit APP751sw-cDNA transfiziert waren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß astrozytäre und neuronale Zellen gleichermaßen in der Lage sind, die amyloidogene APP-Prozessierung durchzuführen. Der Nachweis des amyloidogenen Fragmentes $A\beta$ und des nicht-amyloidogenen Fragmentes p3 im konditionierten Medium transfizierter Astrozyten ließ auf das Vorhandensein einer γ -Sekretaseaktivität in Astrozyten schließen. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß neben den Neuronen auch Astrozyten durch Sekretion von $A\beta$ -Protein direkt zu den amyloidogenen Ablagerungen, dem neuropathologischen Merkmal der Alzheimer-Krankheit, beitragen können.

4.2.6. APP-Prozessierung stabil transfizierter H4-Zellen

Um die astrozytäre amyloidogene APP-Prozessierung besser verfolgen zu können, wurden H4-Zellen stabil mit APP695- und APP695sw-cDNA transfiziert (siehe 3.3.9.) und die proteolytischen Fragmente der APP-Prozessierung, wie in 4.2.4. und 4.2.5. beschrieben, nachgewiesen. Die Zellen wurden mit jeweils 150 μCi [^{35}S]-Methionin metabolisch markiert und

anschließend lysiert. APP und dessen proteolytischen Spaltprodukte wurden mit folgenden Antikörpern aus Zellysat und konditioniertem Medium immunpräzipitiert :

- anti-A4CT : erkennt APP und C-terminale Fragmente im Zellysat
- anti-FdAPP : erkennt sekretorisches APP im konditionierten Medium
- anti-A β (1-40) : erkennt spezifisch A β (1-40) und p3 im konditionierten Medium
- anti-A β (1-42) : erkennt spezifisch A β (1-42) und p3 im konditionierten Medium

Die in Abb. 22 dargestellte Autoradiographie der elektrophoretisch aufgetrennten Immunpräzipitate korrelierte mit den Befunden aus Kap. 4.2.4 und 4.2.5., in denen die Analyse transient transfizierter H4-Zellen beschrieben ist. In H4-Zellen, die stabil mit APP695- und APP695sw-cDNA transfiziert waren, konnten deutlich die C-terminalen Fragmente A4CT und CT nachgewiesen werden (siehe Abb. 22A). Die Sekretion von APP (*secAPP*) war in beiden Transfektanten vergleichbar (siehe Abb. 22B-1), allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede in der A β -und p3-Sekretion (siehe Abb. 22B-2). H4/APP695-Zellen sekretierten große Mengen an p3 und A β (1-40), dagegen sekretierten H4/APP695sw-Zellen vorwiegend A β (1-40). Dieses Sekretionsverhalten spiegelte sich auch in der Sekretion von A β (1-42) bzw. p3 wider (siehe Abb. 22B-3).

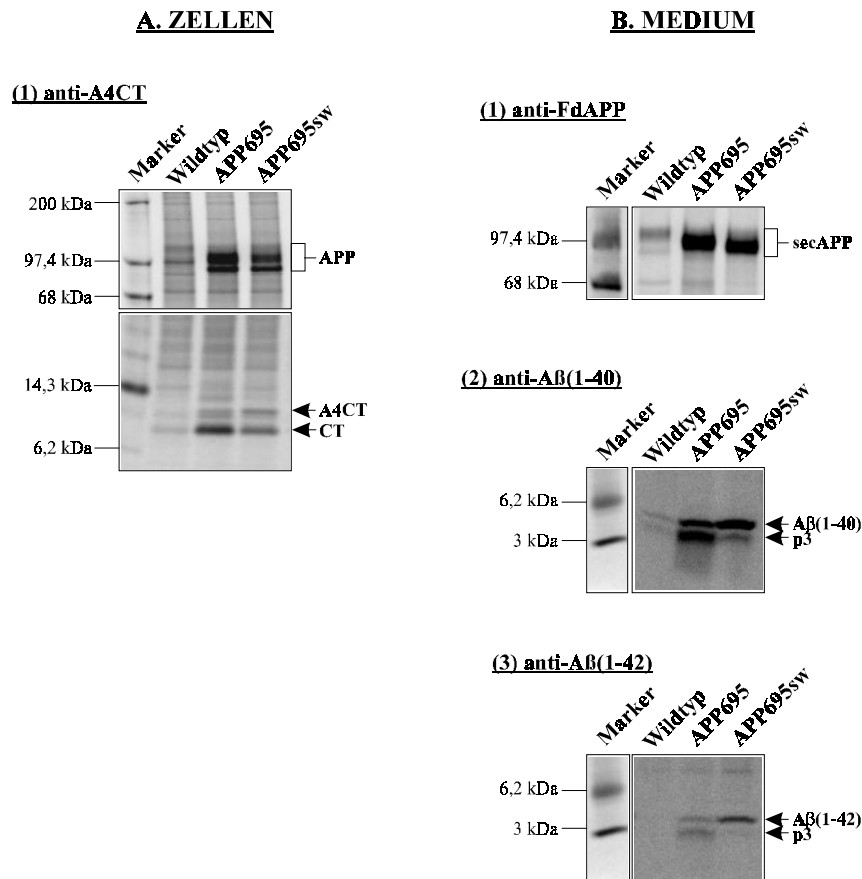


Abb. 22 : APP-Prozessierung stabil transfizierter H4-Zellen

Autoradiographie gelelektrophoretisch aufgetrennter, immunpräzipitierter, [35 S]-markierten APP-Fragmenten aus Zellysaten (A) und konditionierten Medien (B) von H4-Zellen: nichttransfizierte H4-Zellen (Wildtyp), transfizierte H4/pCEP4-APP695- (APP695) und H4/pCEP4-APP695sw-Zellen (APP695sw). Das Zellysat wurde mit anti-A4CT (A), das konditionierte Medium mit anti-FdAPP (1), anti-A β (1-40) (2) und anti-A β (1-42) (3) immunpräzipitiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in NuPage-Gelen. Am linken Bildrand ist der Molmassenstandard eingezeichnet (Marker).

4.2.7. Untersuchung der APP-Prozessierung aktivierter Astrozyten

Ausgehend von der Überlegung, daß aktivierte Astrozyten eine veränderte amyloidogene APP-Prozessierung aufweisen könnten, wurden die mit APP695sw-cDNA stabil transfizierten H4-Zellen mit verschiedenen Mitogenen behandelt, die mit den amyloidogenen Ablagerungen assoziiert sind. Die Zellen wurden in Gegenwart von 100 U IL1 β /ml, 20 bzw. 50 ng TNF α /ml, 100 U IFN γ /ml, 20 oder 50 ng TNF α /ml mit 100 U IFN γ /ml, 200 U IL6/ml, 10 ng bFGF/ml oder 2 ng TGF β /ml metabolisch mit jeweils 100 μ Ci [35 S]-Methionin für 4 h markiert (siehe 3.3.10). Nach Lyse der Zellen wurden Zellysat und konditioniertes Medium für die Immunpräzipitation mit folgenden Antikörpern eingesetzt :

anti-A4CT, anti-A β (1-40), anti-A β (1-42) : siehe S. 77, Kap. 4.2.6.

anti-A β (1-6) : erkennt sekretorisches APP nach α -Sekretaseaktivität (*secAPP α*) und A β im konditioniertem Medium

Die elektrophoretische Auftrennung der Immunpräzipitate erfolgte in NuPage-Gelen (4-12 % Tris/Bicin).

Die Abb. 23 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer autoradiographische Analyse der proteolytischen APP-Fragmente im Zellysat Mitogen-behandelter Zellen. Die Behandlung der Zellen mit Mitogenen führte zu einer geringfügigen Beeinflussung der APP-Expression und Prozessierung zu nicht-amyloidogenen C-terminalen Fragmenten (CT) und amyloidogenem A4CT (Abb. 23A). Die stärksten Effekte waren in Zellen sichtbar, die mit IL1 β , TNF α oder TNF α mit IFN γ behandelt wurden. Unter Einfluß dieser Zytokine akkumulierten nicht-amyloidogene C-terminale Fragmente in den Zellen. Um diese Beobachtung zu verdeutlichen, wurde das Verhältnis von CT zu A4CT nach densitometrischer Auswertung der Autoradiographie mit der Software ImageQuant berechnet und in Abb. 23B graphisch dargestellt. Die Behandlung der Zellen mit den Zytokinen IL1 β , TNF α und TNF α mit IFN γ führte zu einem erhöhtem Verhältnis von CT zu A4CT und spiegelt damit die verstärkte α -Sekretaseaktivität bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung wider. Diese Befunde waren in zwei weiteren Experimenten reproduzierbar.

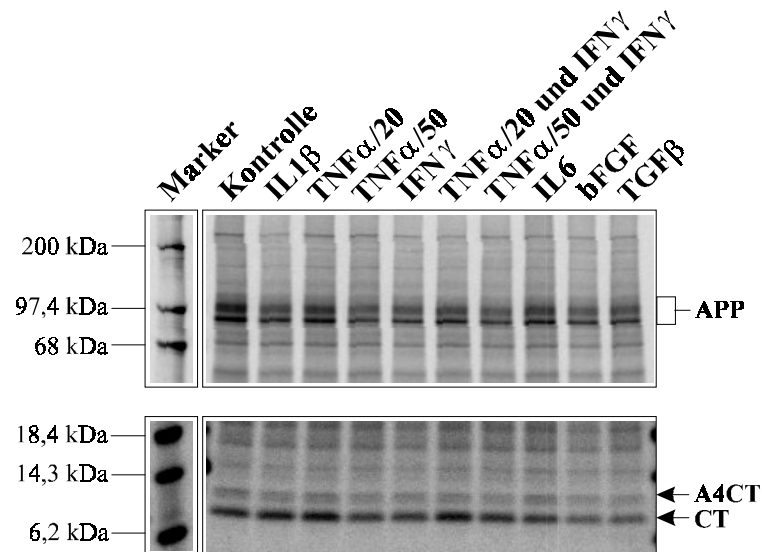
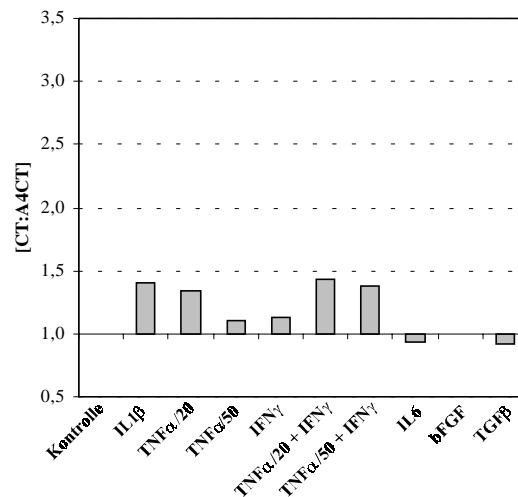
A.**B.**

Abb. 23 : APP-Prozessierung aktivierter H4/APP695sw-Zellen – Analyse der Zellysate

A. H4/APP695sw-Zellen wurden mit 100 U IL1β/ml, 20 bzw. 50 ng TNFα/ml (TNFα/20 bzw. TNFα/50), 100 U IFNγ/ml, 20 oder 50 ng TNFα/ml mit 100 U IFNγ/ml, 200 U IL6/ml, 10 ng bFGF/ml oder 2 ng TGFβ/ml für 4 h während einer metabolischen Markierung mit [³⁵S]-Methionin behandelt. Die gesamte Proteinmenge der mit anti-A4CT präzipitierten Lysatüberstände wurde im NuPage-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. B. Das Diagramm zeigt das Verhältnis [CT:A4CT], das nach densitometrischer Auswertung der Autoradiographie mit der Software ImageQuant berechnet wurde. Die auf gleiche radioaktive Einbaurate (siehe 3.3.7.) korrigierten densitometrischen Meßwerte der Kontrollzellen wurden gleich 1,0 gesetzt. Werte > 1,0 = Zellen zeigen verringerte β-Sekretaseaktivität, Werte < 1,0 = Zellen zeigen verstärkte β-Sekretaseaktivität.

Die autoradiographische Analyse der proteolytischen APP-Fragmente im konditioniertem Medium Mitogen-behandelter Zellen ist in Abb. 24 dargestellt. Das oben beschriebene

Ergebnis, das aus der Analyse der Zellysate hervorging, spiegelte sich in den Befunden aus der Analyse der APP-Fragmente (secAPP α , A β , p3) im konditionierten Medium wider. Die Aktivität der α -Sekretase, gemessen an der Menge von α -sekretorischem APP, wurde besonders durch die Zytokine IL1 β , TNF α und TNF α mit IFN γ verstärkt, während die A β -Sekretion unter Einfluß dieser Zytokine sich verringerte (Abb. 24B-1). Verdeutlicht wurde diese Beobachtung durch die Analyse der A β (1-40)- und p3-Sekretion (Abb.24B-2): Zellen, die mit den Zytokinen IL1 β , TNF α und TNF α mit IFN γ behandelt wurden, sekretierten verstärkt das nicht-amyloidogene p3-Fragment, während die A β (1-40)-Sekretion vermindert wurde. Die Analyse der A β (1-42)-Sekretion zeigte, daß TNF α mit IFN γ am stärksten die A β (1-42)-Sekretion verminderte (siehe Abb. 24B-3, Abb. 25-3). Diese Befunde konnten in zwei weiteren Experimenten bestätigt werden.

Um die aus den Autoradiographien hervorgehenden Beobachtungen deutlicher darzustellen, wurden diese einer densitometrischen Analyse mit der Software ImageQuant unterzogen. Es wurden die Verhältnisse

[secAPP- α :A β]: sekretorisches APP nach α -Sekretaseaktivität (nicht-amyloidogener APP-Prozessierungsweg) zu A β (amyloidogener APP-Prozessierungsweg)

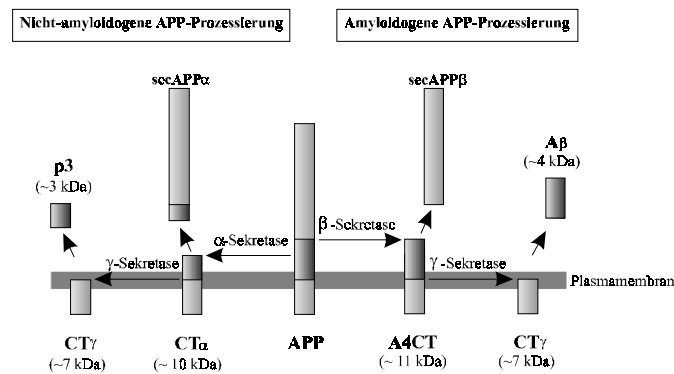
[A β :p3]: A β (1-40) (amyloidogener APP-Prozessierungsweg) zu p3 (nicht-amyloidogener APP-Prozessierungsweg)

und die gemessenen densitometrischen Einheiten an sekretiertem A β (1-42) berechnet und graphisch in Abb. 25 dargestellt.

Das Verhältnis [secAPP α :A β] veränderte sich signifikant nach Behandlung der Zellen mit Zytokinen (Abb. 26-1). Besonders deutlich veränderte sich im Vergleich zur Kontrolle ([secAPP α :A β] = 1,0) das Verhältnis [secAPP α :A β] um den Faktor 3,2 nach Behandlung der Zellen mit 50 ng TNF α /ml mit 100 U IFN γ /ml. Das Verhältnis [p3:A β (1-40)] nahm um den Faktor 1,9 zu, wenn die Zellen mit 50 ng TNF α /ml in Kombination mit 100 U IFN γ /ml behandelt wurden (Abb. 25-2). Dieser Effekt war von der TNF α -Konzentration abhängig.

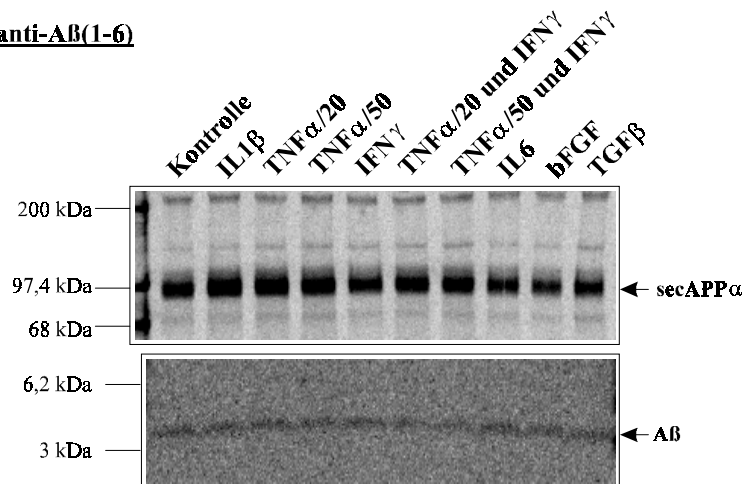
Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, daß Astrozyten, die durch die Zytokine IL1 β , TNF α und TNF α mit IFN γ aktiviert wurden, verstärkt den nicht-amyloidogenen APP-Prozessierungsweg durchführen, der durch Akkumulation nicht-amyloidogener Fragmente (CT), verstärkte Sekretion des APP nach α -Sekretaseaktivität und verstärkte Sekretion des nicht-amyloidogenen p3-Fragmentes bei gleichzeitig verringerten A β -Sekretion gekennzeichnet ist.

A.

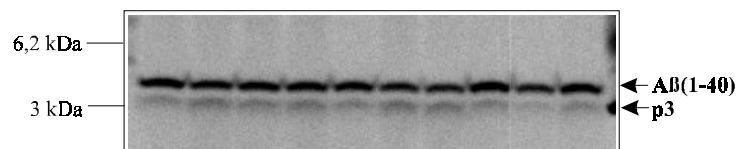


B.

(1) anti-Aβ(1-6)



(2) anti-Aβ(1-40)



(3) anti-Aβ(1-42)

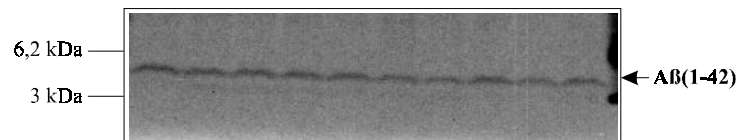
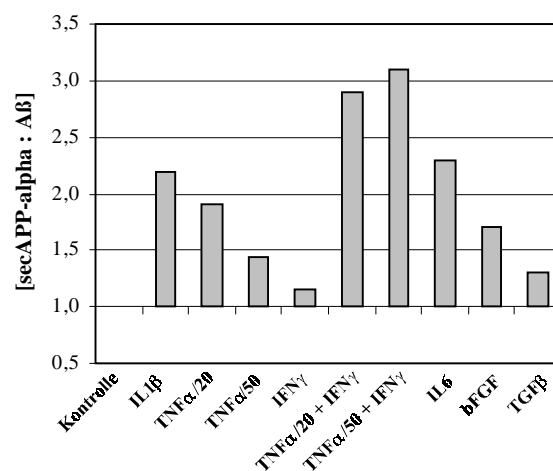


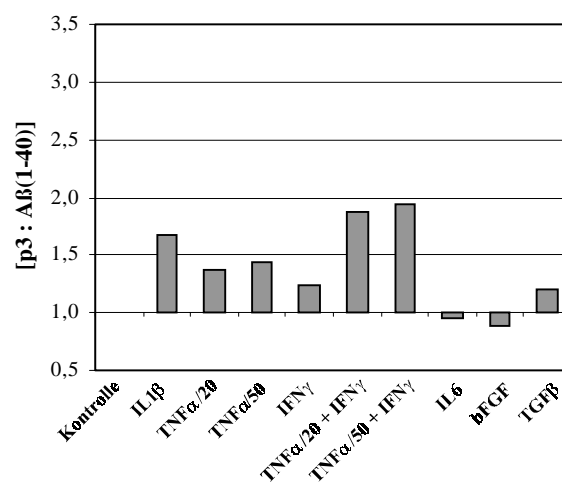
Abb. 24 : APP-Prozessierung aktivierter H4/APP695sw-Zellen – Analyse der konditionierten Medienüberstände

A. Darstellung der APP-Prozessierungswege B. Autoradiographie gelelektrophoretisch aufgetrennter, mit den Antikörpern anti-Aβ(1-6) (1), anti-Aβ(1-40) (2) und anti-Aβ(1-42) (3) immunpräzipitierter ³⁵S-markierter APP-Fragmente aus konditionierten Medien Mitogen-behandelter H4/APP695sw-Zellen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in NuPage-Gelen (4-12 % Tris/Bicin). Sekretorisches APP nach α-Sekretase-aktivität (secAPPα).

(1)



(2)



(3)

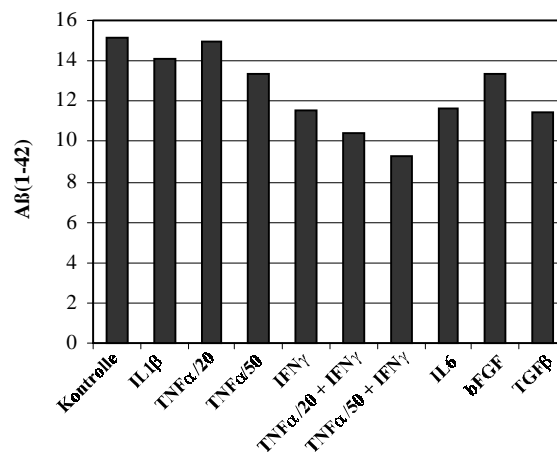


Abb. 25 : APP-Prozessierung aktivierter H4/APP695sw-Zellen

Die Diagramme zeigen das Verhältnis [secAPP α :A β] (1), [p3:A β (1-40)] (2) und die gemessenen, densitometrischen Einheiten der A β (1-42)-Sekretion (3), die nach densitometrischer Auswertung der Autoradiographien (Abb. 24) berechnet wurden. Die auf gleiche radioaktive Einbaurrate korrigierten Werte der Kontrollzellen wurden gleich 1,0 gesetzt (1, 2). Werte > 1,0 = nicht-amyloidogene APP-Prozessierung, Werte < 1,0 = amyloidogene APP-Prozessierung.

5. DISKUSSION

5.1. Astrozytäre Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1

5.1.1. Astrozytäre Zelllinien als Zellkulturmodell für die Analyse der astrozytären ICAM-1-Expression

Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wurde die astrozytäre Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 untersucht. Wie aus immunhisto-chemischen Daten hervorgeht, ist ICAM-1 mit amyloidogenen Ablagerungen und aktivierten Astrozyten im Hirn von Alzheimer-Patienten assoziiert. Daher wird vermutet, daß ICAM-1 eine Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit spielt. Da aus der Literatur bekannt ist, daß primäre Astrozyten-Kulturen ihre ICAM-1-Expression durch die Zytokine IL1 β und TNF α verstärken ([Ballestas & Benveniste, 1995](#)), sollte zunächst überprüft werden, ob vergleichbare Befunde mit astrozytären Zelllinien erzielt werden können. Mit immunzytochemischen und biochemischen Nachweismethoden konnte gezeigt werden, daß auch die ICAM-1-Expression in humane Astrozytom-Zellen (CCF-STTG1-Zellen) durch die Zytokine IL1 β und TNF α verstärkt wird (siehe 4.1.2. und 4.1.4.). Die Stimulation der ICAM-1-Expression der CCF-STTG1-Zellen ist vergleichbar zu der Zytokin-stimulierten ICAM-1-Expression primärer Astrozyten. Allerdings wurde ein Unterschied im Zeitverlauf der ICAM-1-Expression nach Behandlung der Zellen mit TNF α festgestellt. Im Unterschied zu Daten, die von Ballestas und Benveniste ([Ballestas & Benveniste, 1995](#)) veröffentlicht wurden, zeigte sich ein biphasischer Verlauf der ICAM-1-Expression in CCF-STTG1-Zellen (siehe 4.1.5.). Eine erste maximale ICAM-1-Expression wurde nach 18 h durch die Behandlung der Zellen mit TNF α erreicht. Nach 24 h zeigte sich ein zweiter Anstieg der TNF α -verstärkten ICAM-1-Expression. Dieser biphasische Verlauf ist vermutlich aufgrund einer auto- bzw. parakrinen oder synergistischen Wirkung eines weiteren Zytokins wie z.B. IFN γ , das möglicherweise von TNF α -behandelten CCF-STTG1-Zellen nach 24 h ausgeschleust wird, zu erklären (darauf wird in Kap. 5.1.2. eingegangen).

Die Analyse der astrozytären ICAM-1-Expression wurde mit Hilfe eines speziellen ELISA's im Mikrotiterplatten-Format durchgeführt, der in dieser Arbeit entwickelt wurde und auf immunzytochemischen Techniken basiert. Die Untersuchung der astrozytären ICAM-1-Expression mit dem ICAM-1-ELISA lieferte Ergebnisse, die zu den Befunden aus immunzyto- und biochemischen Untersuchungen vergleichbar waren (siehe 4.1.3.).

5.1.2. Astrozytäre ICAM-1-Expression unter Einfluß verschiedener Mitogene

Das Vorhandensein zahlreicher Mitogene in der Nähe amyloidogener Ablagerungen weist auf eine Alzheimer-assoziierte Neuroinflammation hin. Während eines neuroinflammatorischen Prozesses spielen neben den klassischen Zytokinen IL1 β und TNF α noch zahlreiche andere immunmodulatorische Faktoren eine Rolle, deren Bedeutung für die Alzheimer-Pathogenese bisher noch wenig untersucht wurde. In diesem Zusammenhang entstand die Frage, ob neben IL1 β und TNF α noch weitere immunmodulatorische Moleküle die astrozytäre ICAM-1-Expression beeinflussen können. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die astrozytären Zelllinien CCF-STTG1 und H4 mit den Mitogenen IFN γ , TNF α mit IFN γ , TGF β , IL6 und bFGF behandelt und auf ICAM-1-Expression analysiert. Es konnte erstmals gezeigt werden, daß die astrozytäre ICAM-1-Expression am stärksten durch die gleichzeitige Gabe von TNF α und IFN γ stimuliert wurde (siehe 4.1.6.). Die Mitogene TGF β , IL6 und bFGF zeigten keinen Einfluß auf die astrozytäre ICAM-1-Expression. Synergistische Effekte von IFN γ und TNF α wurden auch für die Expression des MHC II-Antigens in Astrozyten beschrieben ([Benveniste et al., 1989](#)), das interessanterweise neben ICAM-1 ebenfalls mit amyloidogenen Ablagerungen assoziiert ist. Das Zusammenwirken von TNF α und IFN γ könnte durch die IFN γ -vermittelte, verstärkte

Expression des TNF α -Rezeptors in Astrozyten erklärt werden ([Benveniste et al., 1989](#)). Durch die verstärkte Expression des TNF α -Rezeptors könnten Astrozyten für TNF α -vermittelte Wirkungen wie z.B. ICAM-1-Expression empfänglicher sein.

Im Zusammenhang mit der synergistischen Wirkung von TNF α und IFN γ steht der in dieser Arbeit gewonnene Befund, daß in CCF-STTG1-Zellen, die mit TNF α behandelt wurden, nach 24 h ein zweiter Anstieg der ICAM-1-Expression zu beobachten war. Eine mögliche Erklärung für diesen biphasischen Verlauf lieferte der Befund von Xiao und Link ([Xiao & Link, 1998](#)), die zeigten, daß Astrozyten, die mit TNF α behandelt wurden, verstärkt IFN γ sekretieren. Nach 24 h könnte durch die TNF α -ausgelöste eigene IFN γ -Sekretion eine synergistische Wirkung der Zytokine TNF α und IFN γ für die starke ICAM-1-Expression verantwortlich sein.

5.1.3. Astrozytäre ICAM-1-Expression unter Einfluß von A β -Protein

Im Vordergrund weiterer Untersuchungen stand die Frage, ob die astrozytäre ICAM-1-Expression durch amyloidogene Ablagerungen verursacht oder verstärkt werden kann. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde gezeigt, daß die Behandlung der Astrozyten mit physiologischem A β -Protein nicht zu ihrer Aktivierung führte (siehe Kap. 4.1.7.). Auch durch Kultivierung der Zellen auf aggregiertem A β -Protein konnte keine verstärkte ICAM-1-Expression erreicht werden. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse anderer Forschungsgruppen, die anhand von Zellkulturexperimenten zeigen konnten, daß Astrozyten durch aggregiertes A β -Protein aktiviert werden können. So wurde durch verschiedenen Autoren beschrieben, daß Astrozyten, die mit aggregiertem A β -Protein für 24 h behandelt wurden, verstärkt Zytokine und Wachstumsfaktoren sekretieren ([Araujo & Cotman, 1992](#); [Hu et al., 1998](#)). CCF-STTG1-Zellen, die mit aggregiertem A β -Protein behandelt wurden, zeigten keine verstärkte Zytokin-Sekretion (persönliche Mitteilung Dr. U. Mönning). Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Befunde liegt möglicherweise im Konformationszustand des eingesetzten A β -Proteins. Für Zellkulturexperimente wird vorwiegend A β -Protein eingesetzt, das durch Inkubation bei 37°C nach 6 Tagen als aggregiertes A β -Protein bezeichnet wird ([Gitter et al., 1995](#)). Große Probleme bereitet hierbei die Tatsache, daß die eingesetzten Protein-Chargen keinen definierten Aggregationszustand aufweisen und dadurch in biologischen Testsystemen auch zu unterschiedlichen Befunden führen können. Um den genauen Aggregationszustand des A β -Proteins zu bestimmen, wären ausgiebige Konformationsstudien notwendig. Eine andere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Befunde hinsichtlich der Astrozyten-Aktivierung durch A β -Protein liegt darin, daß CCF-STTG1-Zellen keinen Rezeptor exprimieren, der mit dem A β -Protein interagiert. Für Mikroglia wurde bereits gezeigt, daß diese Zellen in der Lage sind, aggregiertes A β -Protein über den Scavenger-Rezeptor zu internalisieren ([Paresce et al., 1996](#)). Der Befund, daß Mikroglia und nicht Astrozyten einen anderen Liganden des Scavenger-Rezeptors, das Ac-LDL (*acetyl-low density lipoprotein*), binden können ([Giulian & Baker, 1986](#); [Giulian, 1987](#)), weist darauf hin, daß Astrozyten keinen Scavenger-Rezeptor besitzen, der mit dem A β -Protein interagieren könnte.

5.1.4. Astrozytäre ICAM-1-Expression unter Einfluß konditionierter Medienüberstände aktivierter Mikroglia

Ziel weiterer Untersuchungen war die Klärung der Frage nach dem zellulären Ursprung der Mitogene, die die astrozytäre Aktivität während der Alzheimer-Pathogenese beeinflussen. Obwohl aktivierte Astrozyten ein komplexes Expressionsmuster an immunmodulatorischen Molekülen aufweisen, spielen sie nicht die Schlüsselrolle in der Vermittlung inflammatorischer Reaktionen im ZNS. Die immunkompetenten Zellen des Gehirns sind Mikroglia, die zum mononukleären phagozytären System gehören und daher auch als Gewebsmakrophagen des ZNS bezeichnet werden. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Regulation neuroinflammatorische Prozesse. Mikroglia reagieren wie auch Astrozyten auf eine

pathophysiologische Situation im ZNS, indem sie MHC II-Antigene präsentieren sowie zahlreiche Zytokine und Komplementproteine exprimieren. Die Beobachtung, daß aktivierte Mikroglia verstärkt Zytokine wie IL1 β und TNF α sekretieren (persönliche Mitteilung Dr. U. Mönning), gab Anlaß zur Vermutung, daß die Faktoren, die zur Aktivierung von Astrozyten führen, von den Mikroglia produziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, daß Medienüberstände von Mikroglia, die mit aggregiertem A β -Protein für 5 Tage behandelt wurden, die astrozytäre ICAM-1-Expression signifikant verstärken, dagegen konditioniertes Medium von Mikroglia, die mit monomerem A β -Protein behandelt wurden, nur leicht die Astrozyten-Aktivität induziert (siehe Kap. 4.1.8.). Aus diesen Befunden läßt sich folgern, daß die Astrozyten-Aktivierung eine sekundäre Folgereaktion der Mikroglia-Aktivierung in der Alzheimer-Pathogenese ist. Diese Schlußfolgerung steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß in transgenen Mäusen mit amyloidogenen Ablagerungen zuerst eine reaktive Mikrogliose (aktivierte Mikroglia) und erst darauffolgend eine Astrogliose beobachtet werden kann ([Games et al., 1995](#); [Irizarry et al., 1997](#)).

5.2. Signaltransduktionsweg der astrozytären ICAM-1-Expression

5.2.1. Pharmakologische Beeinflussung der astrozytäre ICAM-1-Expression

Da aktivierte Astrozyten die Alzheimer-Pathogenese durch die Sekretion von Plaque-fördernden Substanzen erheblich verstärken können, war es von Interesse, den Signaltransduktionsweg der Astrozyten-Aktivierung näher zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden pharmakologische und physiologisch-vorkommende Substanzen in ihrer Wirkung auf die astrozytäre ICAM-1-Expression getestet. Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, daß die astrozytäre ICAM-1-Expression nur durch Vorbehandlung mit cAMP-erhöhenden Substanzen wie z.B. Forskolin, Rolipram und K-252a vermindert wird (siehe Kap. 4.1.9.). Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration kann einerseits direkt durch Aktivierung der Adenylatzyklase wie z.B. durch Forskolin erfolgen, oder indirekt durch Hemmung von cAMP-abhängigen Proteinkinasen wie beispielsweise der cAMP-abhängige Phosphodiesterase IV (Rolipram). Intrazelluläres cAMP beeinflusst eine Vielzahl von Reaktionen in Astrozyten wie z.B. Differenzierung, Phosphorylierung von Proteinen, Glutamat-Metabolismus, Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren ([Bridoux et al., 1986](#); [Harrison & Mobley, 1989](#); [Zielke et al., 1990](#); [Schwartz & Mishler, 1990](#); [Grimaldi et al., 1994](#)) und vermindert oftmals die Immunantwort vieler Zelltypen. So hemmen z.B. erhöhte cAMP-Level die Zytokin-induzierte Expression von ELAM (*endothelial leukocyte adhesion molecule*) in HUVEC-Zellen (*human umbilical vein endothelial cell*) sowie die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) in glatten Muskelzellen aus der Lunge ([Pober et al., 1993](#); [Panettieri et al., 1995](#)). Einen Hinweis über PKC-vermittelte ICAM-1-Expression in Astrozyten lieferten die Arbeiten von Ballestas und Benveniste ([Ballestas & Benveniste, 1995](#)), die durch Calphostin C, ein Hemmstoff der Proteinkinase C (PKC), eine verringerte astrozytäre ICAM-1-Expression erhielten. Diese Daten konnten jedoch durch die hier vorliegende Arbeit mit Hilfe eines anderen Hemmstoffes der PKC, das Bisindolylmaleimids, nicht bestätigt werden.

5.2.2. Physiologische Beeinflussung der astrozytären ICAM-1-Expression

Eine zu Forskolin oder Rolipram vergleichbare Wirkung zeigten physiologisch- vorkommenden Prostaglandine, die cAMP-gekoppelte Signaltransduktionswege verfolgen. Prostaglandine sind hormonähnliche Substanzen, die über den Fettstoffwechselweg aus Arachidonsäure mittels der Cyclooxygenase synthetisiert werden. Sie spielen u.a. eine Rolle in inflammatorischen Prozessen, regulieren den Blutfluß zu bestimmten Organen und kontrollieren den Ionentransport durch die Membran. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß eine Vorbehandlung mit PGE₂ und PGD₂-Analoga die Zytokin-stimulierte ICAM-1-Expression in Astrozyten verringern (siehe Kap. 4.1.10.). Eine zu PGE₂ vergleichbare Hemmung der astrozytären ICAM-1-Expression war durch die Behandlung der Zellen mit PGE₁ erzielbar,

dagegen zeigte $\text{PGF2}\alpha$ keinen Einfluß auf die Zytokin-stimulierte ICAM-1-Expression. Diese Befunde passen zu den veröffentlichten Daten von Ito *et al.* (Ito *et al.*, 1992), die belegen, daß PGE1 , PGE2 sowie PGD2 die intrazelluläre cAMP-Konzentration in Astrozyten erhöhen. Für Zellen des peripheren Nervensystems wurde bereits gezeigt, daß die Ligandenbindung an die Prostaglandin-Rezeptoren DP und EP2 zu einer Aktivierung cAMP-gekoppelter Signaltransduktionswege führt (Ito *et al.*, 1989; Kunkel *et al.*, 1988). Im Gegensatz dazu ist bekannt, daß der Rezeptor für $\text{PGF2}\alpha$ keine cAMP-gekoppelten Signaltransduktionswege verfolgt (Hammarstrom, 1982; Smith *et al.*, 1988).

Mit Prostaglandin wurde eine physiologische, cAMP-erhöhende Substanz identifiziert, die in der Lage ist, die astrozytäre ICAM-1-Expression und damit die astrozytäre Aktivität zu beeinflussen. Allerdings war eine Verringerung der Astrozyten-Aktivierung nur möglich, wenn die Zellen zuerst mit Prostaglandinen und anschließend mit Zytokinen behandelt wurden. Der gleiche Effekt war auch bei Beeinflussung der astrozytären ICAM-1-Expression durch Forskolin, Rolipram und K-252a zu beobachten (siehe 4.1.9.). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, daß aktivierte Astrozyten hohe Mengen an PGE2 sekretieren, wenn sie mit $\text{IL1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ und konditioniertem Medium aktivierter Mikroglia behandelt wurden (siehe Kap. 4.1.11.). Das bedeutet, daß aktivierte Astrozyten durch ihre eigene PGE2 -Sekretion nicht in der Lage sind, ihre eigene Aktivität zu regulieren, wie es beispielsweise für die $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte IL6 -Sekretion beschrieben ist. Allerdings könnten Prostaglandine die räumliche Ausbreitung der Astrozyten-Aktivierung im inflammatorischen Bereich des Gewebes kontrollieren. Ruhende Astrozyten, die außerhalb eines inflammatorischen Bereiches gelegen sind, würden durch die PGE2 -Sekretion der aktivierten Astrozyten, die in der Nähe des inflammatorischen Bereiches gelegen sind, in ihrer Aktivierung gehemmt sein (siehe Abb. 26).

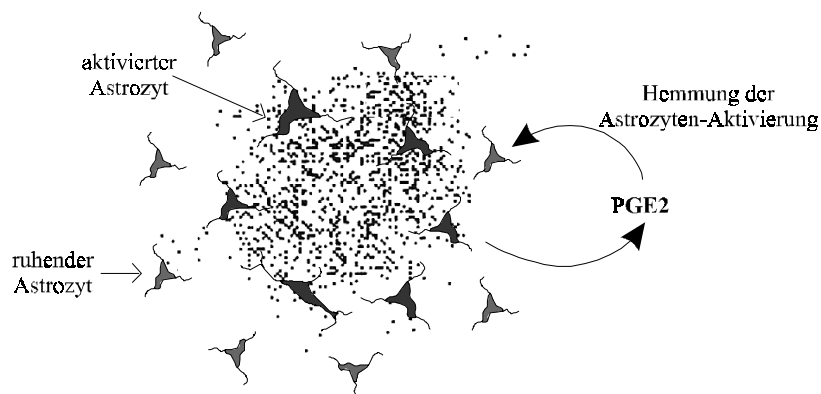


Abb. 26 : Hemmung der räumlichen Ausbreitung der Astrozyten-Aktivierung

Aktivierte Astrozyten, die in einem inflammatorischen Bereich gelegen sind, könnten durch die verstärkte PGE2 -Sekretion das räumliche Ausmaß der Astrozyten-Aktivierung vermindern.

5.2.3. Unterschiedliche Hemmung der $\text{IL1}\beta$ - und $\text{TNF}\alpha$ -verstärkten ICAM-1-Expression

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, war die Beeinflussung der astrozytären ICAM-1-Expression durch pharmakologische und physiologische Substanzen je nach Zytokin-Stimulation unterschiedlich. Auffällig war, daß die Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -verstärkten ICAM-1-Expression zwar ähnliche Ergebnisse wie die $\text{IL1}\beta$ -vermittelte Aktivierung der Zellen zeigte, jedoch die Hemmung der $\text{IL1}\beta$ -Stimulation deutlich stärker war. Dies kann darin begründet sein, daß die $\text{IL1}\beta$ - und $\text{TNF}\alpha$ -verstärkte ICAM-1-Expression durch teilweise unterschiedliche cAMP-gekoppelte Signaltransduktionswege reguliert wird. Es ist bekannt, daß Zytokin-Rezeptoren G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionswege verfolgen, die zu einer Aktivierung der MAP-

Kinase (*mitogen activated protein kinase*), SAP-Kinase (stress-activated protein kinase) oder p38-Kinase (auch als HOG, *high osmolarity glycerol response kinase*, bezeichnet) führen. Es gibt Hinweise auf ein Zytokin-spezifisches Aktivierungsmuster dieser Kinasen ([Eder, 1997](#)), woraus sich folgern läßt, daß die Aktivität der Kinasen unterschiedlich stark sensitiv zu cAMP-erhöhenden Substanzen sein könnte.

5.3. Astrozytäre Expression und Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins APP

5.3.1. Amyloidogene APP-Prozessierung astrozytärer Zellen

Die in dieser Arbeit durchgeführte vergleichende Analyse der neuronalen und astrozytären APP-Prozessierung ergab, daß neben den Neuronen auch Astrozyten über eine β - und γ -Sekretaseaktivität verfügen und somit durch Sekretion des A β -Proteins zu dem neuropathologischen Merkmal der Alzheimer-Krankheit, den amyloidogenen Ablagerungen, beitragen können. Es konnten eindeutig das amyloidogene APP-Fragment A4CT in Zellysaten und die Sekretion des A β -Proteins in den Medienüberstand humaner astrozytärer Zelllinien nachgewiesen werden. Diese Daten passen zu den Ergebnissen von Le Blanc *et al.* ([Le Blanc et al., 1997](#)) und Busciglio *et al.* ([Busciglio et al., 1993](#)), die anhand von primär kultivierten Astrozyten und Neuronen aus Humangewebe zeigen konnten, daß sich Astrozyten und Neurone in ihrer amyloidogenen APP-Prozessierung wenig unterscheiden. Mit diesen Befunden weisen sie ebenfalls auf die Möglichkeit hin, daß Astrozyten eine direkte Rolle in der Alzheimer-assoziierten Amyloidogenese spielen können. In diesem Zusammenhang steht auch der Befund, daß in primär kultivierten Astrozyten und Neuronen aus Rattengewebe kein A β -Protein nachgewiesen werden konnte (siehe 4.2.2.). Im Gegensatz zu diesem Ergebnis konnten Le Blanc *et al.* ([Le Blanc et al., 1996](#)) und Busciglio *et al.* ([Busciglio et al., 1993](#)) eine schwache A β -Sekretion in primär kultivierten Astrozyten und Neuronen aus Rattengewebe zeigen. Die schwache Sekretion des A β -Proteins in primären Zellkulturen aus Rattengewebe könnte mit der Beobachtung, daß in älteren Nagetieren keine amyloidogenen Ablagerungen auftreten, im engen Zusammenhang stehen. De Strooper *et al.* ([de Strooper et al., 1995](#)) vertreten die Hypothese, daß die Ursache dafür in der A β -Sequenz der Maus liegt, die die Sekretaseaktivitäten, die zur Freisetzung des A β -Proteins führen, beeinflussen könnte ([de Strooper et al., 1995](#)). Wie aus Abb. 27 ersichtlich ist, unterscheiden sich A β -Sequenz des Menschen und der Maus im N-Terminus durch drei Aminosäureaustausche, wobei die mäusele Sequenz in dieser Region identisch zur Rattensequenz ist ([Shivers et al., 1988](#)). Eine weitere Studie, in der durch „Humanisierung“ der mäusele APP-Sequenz in primären hippocampalen Neuronen aus der Ratte eine verstärkte Sekretion an A β beobachtet werden konnte ([de Strooper et al., 1995](#)), unterstützt diese Vermutung.

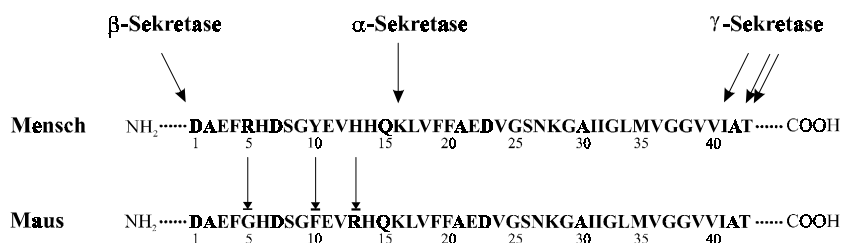


Abb. 27 : A β -Sequenz des Menschen und der Maus

Es sind sowohl die Aminosäureaustausche in der humanen und mäusele A β -Sequenz an den Positionen A β -AS5 (Arg→Gly), A β -AS10 (Tyr→Phe) und A β -AS16 (Lys→Arg) als auch die potentiellen Schnittstellen der Sekretaseaktivitäten dargestellt.

Desweiteren wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Astrozyten in der Lage sind, die hinsichtlich des C-Terminus heterogen-vorkommenden A β -Proteine A β (1-40) und A β (1-42) zu sekretieren. In konditionierten Medienüberständen astrozytärer Zellen, die die APP-cDNA mit der schwedischen Mutation exprimierten, konnte eindeutig A β (1-42) nachgewiesen werden (siehe 4.2.5.). Mit Hilfe von transfizierten humanen Zellen der Niere (HK293) konnte bereits gezeigt werden, daß die schwedische Mutation zu einer verstärkten Sekretion von A β (1-40) und A β (1-42) führt ([Citron et al., 1992](#)). Welche Rolle die Freisetzung der unterschiedlich langen A β -Proteine in der Alzheimer-assoziierten Amyloidogenese spielen, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Jarret *et al.* ([Jarret et al., 1994](#)) konnten zeigen, daß A β (1-42) aufgrund der zwei zusätzlichen hydrophoben Aminosäuren Isoleucin und Alanin wesentlich schneller zu A β -Filamenten aggregiert als A β (1-40). Die Aggregation des A β (1-42) führt wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung derjenigen Bereiche im A β -Protein, die an der Polymerisation zu β -Faltblattstrukturen beteiligt sind. Nur bei einer solchen β -Faltblattstruktur bilden sich besonders stabile Aggregate aus A β -Protein, die durch weitere Anlagerung von A β -Protein schließlich die Alzheimer-typischen Amyloid-Plaques ausbilden. Da somit die Entstehung des A β (1-42)-Proteins eine pathophysiologische Rolle in der Alzheimer-Pathogenese spielt, wurden in der hier vorliegenden Arbeit H4-Zellen stabil mit APP695sw-cDNA (APP695 mit schwedischer Mutation) transfiziert, in denen die amyloidogene APP-Fragmente gut nachweisbar waren (siehe 4.2.6.).

5.3.2. Amyloidogene APP-Prozessierung aktivierter Astrozyten

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, auf welche Weise aktivierte Astrozyten ihre amyloidogene APP-Prozessierung verändern. Es konnte mittels der ICAM-1-Expression gezeigt werden, daß Astrozyten durch die Zytokine IL1 β , TNF α und IFN γ aktiviert werden. Wie Untersuchungen an Tier- und Zellkulturmodellen verschiedener Arbeitsgruppen belegen, verstärken aktivierte Astrozyten ihre APP-Expression ([Siman et al., 1989](#); [Gray & Patel, 1993a](#), [Gray & Patel, 1993b](#)). Diese Befunde sowie die Tatsache, daß auch Astrozyten den amyloidogenen Prozessierungsweg durchführen können, ließen vermuten, daß aktivierte Astrozyten direkt zur Alzheimer-assoziierten Amyloidogenese durch verstärkte A β -Sekretion beitragen könnten. Diese Vermutung konnte jedoch nicht bestätigt werden. Im Gegenteil: Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß sich die APP-Prozessierung aktivierter Astrozyten zugunsten des nicht-amyloidogenen Prozessierungsweges verlagert. Ein charakteristisches Merkmal aktivierter Astrozyten ist die verstärkte Aktivität der α -Sekretase in der APP-Prozessierung. Astrozyten, die mit den Zytokinen IL1 β , TNF α und TNF α mit IFN γ aktiviert wurden, akkumulierten nicht-amyloidogene C-terminale Fragmente, sekretierten verstärkt sekretorisches APP nach α -Sekretaseaktivität und zeigten eine verringerte A β -Sekretion bei gleichzeitig verstärkter Sekretion des nicht-amyloidogenen p3-Fragmentes.

5.4. Mögliche pathophysiologische Rolle aktivierter Astrozyten in der Alzheimer-Pathogenese

In diesem Kapitel sollte die pathophysiologische Rolle aktivierter Astrozyten in der Alzheimer-Pathogenese im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit gewonnenen Befunden und den von anderen Forschungsgruppen veröffentlichten Befunden diskutiert werden.

5.4.1. Rekrutierung von Mikroglia als pathophysiologische Rolle des ICAM-1

Aktivierte Astrozyten könnten durch verstärkte Expression des ICAM-1 die neuronale Degeneration auslösen, indem sie das Verhalten der Mikroglia funktionell beeinflussen. ICAM-1 gehört zur Immunglobulin-Superfamilie der Adhäsionsrezeptoren, deren Liganden die β 2-Integrine LFA-1 (CD11a, *leukocyte function-associated antigen 1*) und MAC-1 (CD11b,

macrophage antigen 1) sind. Welche Rolle das Adhäsionsmolekül ICAM-1 in der Alzheimer Pathogenese spielt, wurde bisher noch nicht untersucht. Verbeek *et al.* ([Verbeek et al., 1994](#)) und Eikelenboom *et al.* ([Eikelenboom et al., 1994](#)) beobachteten, daß ICAM-1 mit diffusen Plaques und noch stärker mit senilen Plaques assoziiert ist und demnach in einem frühen Stadium der Alzheimer-Pathogenese entsteht. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, daß Plaque-assoziierte Mikroglia immunreaktiv für den ICAM-1-Liganden LFA-1 sind ([Rozeumuller et al., 1989](#)). Diese Befunde lassen vermuten, daß Mikroglia über das ICAM-1-/LFA-1-Adhäsionssystem mit Astrozyten in Wechselwirkung treten und dadurch eine weitere Rekrutierung der Mikroglia in den zentralen Bereich der Plaques ausgelöst wird. Aktivierte Mikroglia sind in der Lage, zahlreiche neurotoxische Faktoren zu produzieren, wodurch sie dann die neuronale Degeneration fördern könnten. Einen Hinweis für die schädigende Wirkung der Mikroglia lieferten die Befunde von Meda *et al.* ([Meda et al., 1995](#)), die zeigen konnten, daß Mikroglia, die mit A β -Protein und IFN γ behandelt wurden, verstärkt den neurotoxischen Faktor NO sekretieren.

5.4.2. Astrozytäre Sekretion von Plaque-katalysierenden Substanzen

Aktivierte Astrozyten könnten auch durch Ausschleusung Plaque-fördernder Faktoren an der Alzheimer-assoziierten Amyloidogenese beteiligt sein. So stehen z.B. der Proteaseninhibitor α -1-Antichymotrypsin und das Lipidtransportprotein Apolipoprotein E (ApoE) im Verdacht, durch ihre spezifische Affinität zu dem A β -Protein die Fibrillenbildung des A β -Proteins zu beschleunigen und damit die Plaque-Entstehung wesentlich zu beeinflussen ([Abraham et al., 1988](#); [Potter, 1992](#); [Namba et al., 1991](#); [Wisniewski et al., 1993](#); [Ma et al., 1994](#)). Interessanterweise konnten Pasternack *et al.* ([Pasternack et al., 1989](#)) eine astrozytäre Expression von α -1-Antichymotrypsin in der Nähe amyloidogener Ablagerungen nachweisen. Durch Zellkulturexperimente konnte Potter ([Potter, 1992](#)) zeigen, daß IL1-behandelte Astrozyten verstärkt α -1-Antichymotrypsin exprimieren. Diese Befunde lassen vermuten, daß aktivierte Astrozyten durch verstärkte Ausschleusung von α -1-Antichymotrypsin sowie ApoE die Plaquebildung wesentlich beeinflussen können.

Als Plaque-katalysierende Faktoren stehen auch sekretorisches APP751 und APP770 im Verdacht, die Entstehung amyloidogener Ablagerungen zu beeinflussen. Naidu *et al.* ([Naidu et al., 1995](#)) konnten zeigen, daß die Isoformen APP751 und APP770, die eine KPI-Domäne (*Kunitz Typ II Serin-Proteinase-Inhibitor*) enthalten, die die Degradation des A β -Proteins verhindern können. Wie schon von anderen Autoren mittels APP-mRNA-Analysen ([Gray & Patel, 1993a](#), [Gray & Patel, 1993b](#)) und im Rahmen dieser Arbeit mittels Protein-Analysen gezeigt wurde, werden die APP-Isoformen zelltypspezifisch exprimiert: Die im Rattenhirn dominierende Isoform APP695 ist neuronalen Ursprungs, dagegen wird die Isoform APP751 von Astrozyten exprimiert (siehe 4.2.2.). Zusammen mit den Befunden von Naidu *et al.* ([Naidu et al., 1995](#)) läßt sich daraus schließen, daß aktivierte Astrozyten, die verstärkt APP751 sekretieren, zu einer weiteren Akkumulation amyloidogener Ablagerungen beitragen könnten, indem sie die Degradation des A β -Proteins verhindern. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß Astrozyten durch ihre verstärkte APP-Sekretion das neuronale Milieu begünstigen, da gezeigt werden konnte, daß sekretierte Formen von APP eine stimulierende Wirkung auf das Zellwachstum besitzen ([Saitoh et al., 1989](#)) und in neuronalen Zellen das Neuritenwachstum fördern ([Milward et al., 1992](#)).

Neben den oben genannten Plaque-katalysierenden Faktoren könnte man auch vermuten, daß aktivierte Astrozyten durch Sekretion immunmodulatorischer Substanzen die amyloidogene APP-Prozessierung der Neurone beeinflussen und somit über eine Auslösung der verstärkten neuronalen A β -Sekretion zur Plaque-Bildung beitragen. Del Bo *et al.* ([del Bo et al., 1995](#)) konnten zeigen, daß IL6-behandelte Neuronen ihre APP-mRNA-Expression verstärken. Es wäre vorstellbar, daß dadurch auch die A β -Sekretion der Neurone verstärkt wird. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang, daß A β -aktivierte Astrozyten verstärkt IL6 sekretieren ([Forloni et al., 1997](#)). Aus diesen Daten läßt sich ein Modell für die Rolle der

Astrozyten in der Alzheimer-Pathogenese ableiten, in dem Astrozyten, die durch neuronales A β aktiviert werden, durch verstärkte Sekretion von IL6 eine weitere neuronale A β -Sekretion induzieren. Die Folge wäre eine Akkumulation amyloidogener A β -Proteine, die aggregieren und zu einer Transformation vom diffusen in den senilen Plaque führen.

5.4.3. Störung der Hirnhomöostase

Es ist vorstellbar, daß Astrozyten aufgrund ihres komplexen Aufgabenbereiches eine pathophysiologische Rolle in der Alzheimer-Krankheit spielen können. So könnte man vermuten, daß durch eine übermäßige Aktivierung der Astrozyten die Hirnhomöostase gestört wird. Astrozyten sind in der Lage, eine Vielzahl von Substanzen zu sekretieren, die sowohl neurotroph (z.B. NGF, bFGF) als auch neuroprotektiv (z.B. Glutamat-, GABA-Aufnahme) auf das neuronale Milieu wirken. Astrozyten metabolisieren Glutamat, das von den Neuronen in den perisynaptischen extrazellulären Raum freigesetzt wird, und konvertieren diesen Neurotransmitter über einen „*recycling pathway*“ zu Glutamin, das von den Neuronen aufgenommen werden kann. Desweiteren regulieren sie als „Zwischenspeicher für Kaliumionen“ das Gleichgewicht des Ionenhaushaltes im ZNS. Es wäre möglich, daß eine übermäßige Astrozyten-Aktivierung zu einer Dysregulation dieser Hirnhomöostase führen könnte und letztendlich die neuronale Degeneration auslöst. So könnte eine Astrozyten-Aktivierung z.B. zu einer Störung des Glutamat-Recycling-Pathways und Ionenhaushaltes führen.

5.5. Modell über zelluläre, neuroinflammatorische Vorgänge in der Alzheimer-Pathogenese

Basierend auf dem von Griffin ([Griffin et al., 1995](#)) beschriebenen Modell für die Rolle der Mikroglia in der Plaque-Entstehung wurde aufgrund der in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse ein Modell über die zellulären, neuroinflammatorischen Prozesse in der Alzheimer-Pathogenese entwickelt, das in der Abb. 28 dargestellt ist.

Die am frühesten sichtbare Veränderung im Hirn eines Alzheimer-Patienten sind diffuse Plaques ([von Braunmühl, 1937](#)), die von ruhenden Astrozyten und vereinzelt von Mikroglia umgeben sind. Dagegen sind senile Plaques mit aktivierten Astrozyten und aktivierten Mikroglia assoziiert ([Akiyama et al., 1996](#)). Diese Beobachtung führt zu der Frage, warum Mikroglia in den Plaquebereich einwandern, und warum Astrozyten und Mikroglia zu ihrer aktivierten Form transformieren. Es wird vermutet, daß das A β -Protein auf Mikroglia chemotaktisch wirkt ([Davis et al., 1992](#)). Diese Vermutung sowie die Tatsache, daß in transgenen Alzheimer-Mäusen zuerst eine reaktive Mikrogliose auftritt, weisen darauf hin, daß zunächst Mikroglia in den Plaquebereich einwandern. Es ist vorstellbar, daß das von den Neuronen sekretierte A β -Protein einen Konzentrationsgradienten ausbildet, der Mikroglia dazu veranlaßt, in den Plaquebereich einzuwandern. Durch verschiedene Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, daß A β -Protein nicht nur die Migration der Mikroglia auslösen, sondern auch eine nachfolgende Aktivierung induzieren kann ([Meda et al., 1995](#); [Lorton et al., 1996](#)). Es werden anhand des morphologischen und sekretorischen Verhaltens „*frisch aktivierte Mikroglia*“ im Anfangsstadium einer pathophysiologischen Situation im ZNS und „*zytotoxische Mikroglia*“, die durch Ausschleusung zahlreicher neurotoxischer Substanzen die neuronale Degeneration auslösen können, unterschieden. Die Migration von Mikroglia in die Nähe der amyloidogenen Ablagerungen könnte so zu einer Mikroglia-Aktivierung im Anfangsstadium führen, die durch verstärkte Zytokin-Sekretion wie beispielsweise IL1 β und TNF α und verstärkte Expression des β 2-Integrins LFA-1 gekennzeichnet ist. Die Zytokine, die von den „*frisch aktivierten Mikroglia*“ sekretiert werden, sind wiederum in der Lage, das molekulare Profil der Astrozyten zu verändern. Wie in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, können diese Zytokine sowie konditioniertes Medium A β -aktivierter Mikroglia die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in Astrozyten verstärken. ICAM-1 könnte somit ein direkter Interaktionspartner für LFA-1-exprimierende Mikroglia darstellen, so daß Mikroglia über das ICAM-1/LFA-1-

Adhäsionssystem in das Zentrum der amyloidogenen Ablagerungen einwandern können. Dies könnte zu einer weiteren Aktivierung der Mikroglia führen, wodurch „*frisch aktivierte Mikroglia*“ letztendlich zu „*zytotoxische Mikroglia*“ transformieren könnten. Aktivierte Astrozyten könnten durch verstärkte Sekretion von Plaque-katalysierenden Substanzen wie beispielsweise α -1-Antichymotrypsin, ApoE, sekretorisches APP751 sowie IL6 die Akkumulation amyloidogener Ablagerungen bzw. die neuronale A β -Sekretion fördern und neben den Mikroglia die Transformation des diffusen in den senilen Plaque verursachen. Die Folge wäre eine verstärkte Ausschleusung weiterer immunmodulatorischer Moleküle sowie neurotoxischer Substanzen, die zu einem völligen Zusammenbruch der Hirnhomöostase und letztendlich zur Neurodegeneration führen könnte.

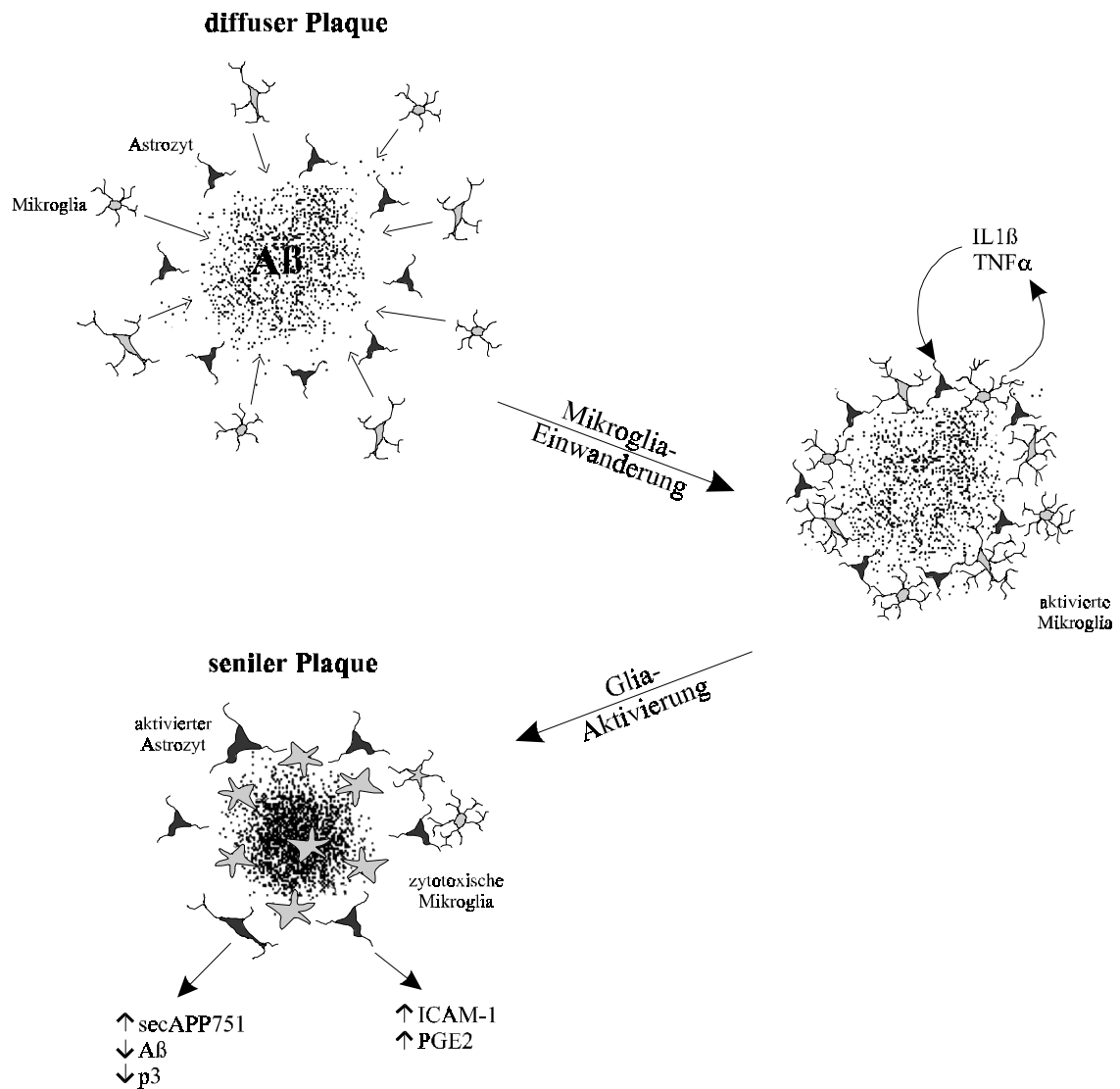


Abb. 28 : Modell über zelluläre, neuroinflammatorische Prozesse in der Alzheimer-Pathogenese

5.6. Therapeutische Ansatzpunkte und Ausblick

Zusammenfassend weisen die in dieser Arbeit gewonnenen Befunde darauf hin, daß aktivierte Astrozyten durch Expression und Sekretion Plaque-fördernder Substanzen (ICAM-1, sekretorisches APP751) eine pathophysiologische Rolle in der Alzheimer-Pathogenese spielen können. Die erzielten Ergebnisse zeigen, daß die Astrozyten-Aktivierung, gemessen an der ICAM-1-Expression, durch präventive Maßnahmen inhibiert werden kann. Nur durch Vorbehandlung mit cAMP-erhöhenden Substanzen wie z.B. mit Forskolin, Rolipram sowie mit den physiologisch vorkommenden Prostaglandinen war eine Astrozyten-Aktivierung zu verringern. Diese Befunde führen zu der Überlegung, inwiefern Prostaglandine die geeigneten Kandidaten zur Behandlung der Astrozyten-Aktivierung in der Alzheimer-Krankheit sein könnten. Es ist jedoch fragwürdig, ob Prostaglandine als Therapeutikum für die Alzheimer-Krankheit eingesetzt werden sollten, da gerade Inhibitoren der Prostaglandin-Synthese, sog. NSAID's (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*), gezeigt haben, das sich das Risiko, an Alzheimer zu erkranken, bei einer regelmäßigen Einnahme dieser Medikamente um das 6 bis 12fache verringert ([Jenkinson et al., 1989](#)). Prostaglandine können neben der in dieser Arbeit gezeigten Verminderung der Astrozyten-Aktivierung auch noch andere physiologische Vorgänge in diesen Zellen beeinflussen. So wird vermutet, daß Prostaglandine die Glutamat-Aufnahme der Astrozyten hemmen ([Vaughn et al., 1991](#)). Da jedoch eine wesentliche, neuroprotektive Aufgabe der Astrozyten in der Metabolisierung des Glutamats besteht (siehe 5.4.4.), würde durch die Applikation von Prostaglandinen der „*Glutamat-Recycling-Pathway*“ zwischen Neuronen und Astrozyten unterbrochen werden und somit einen neuronalen Zelltod auslösen können. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß anstelle von Prostaglandinen andere, spezifische cAMP-erhöhende Substanzen identifiziert werden müssen, die die astrozytäre Aktivität während der Alzheimer-Pathogenese hemmen.

Weitere Untersuchungen hinsichtlich der pathophysiologischen Rolle aktivierter Astrozyten in der Alzheimer-Pathogenese wären sinnvoll, um zusätzliche Grundlagen für die Ätiologie der Alzheimer-Krankheit zu gewinnen. Dabei sollte die Untersuchung der Alzheimer-assoziierten Neuroinflammation an transgenen Tiermodellen, die aufgrund verstärkter Expression der APP-cDNA mit FAD-Mutationen die für die Alzheimer-Krankheit spezifische Plaque-Bildung zeigen, im Vordergrund stehen.

Literaturverzeichnis

- [Abraham et al., 1988](#): Abraham, C.R., Selkoe, D.J. und Potter, H. Cell 52 (1988) 487-501
- [Akiyama et al., 1990](#): Akiyama, H. und McGeer, P.L.. J. Neuroimmunol. 30 (1990) 81-93
- [Akiyama et al., 1991](#): Akiyama, H., Kawamata, T., Dedhar, S. und McGeer, P.L.. J. Neuroimmunol. 32 (1991) 19-28
- [Akiyama et al., 1993](#): Akiyama, H.; Kawamata, T.; Yamada, T.; Tooyama, I.; Ishii, T. und McGeer, P.L.. Acta Neuropathol. 85 (1993) 628-634
- [Akiyama et al., 1996](#): Akiyama, H.; Schwab, C.; Kondo, H.; Mori, H.; Kametani, F.; Ikeda, K. und McGeer, P.L.. Neurosci. Lett. 206 (1996) 169-172
- [Alzheimer, 1906](#): Alzheimer, A. Zentralblatt für Nervenheilkunde und Psychiatrie 30 (1906) 177-179
- [Alzheimer, 1907](#): Alzheimer, A. Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtl. Med. 79 (1907) 23-48
- [Amaducci et al., 1981](#): Amaducci, L.; Forno, K.I. und Eng, L.F. Neurosci. Lett. 21 (1981) 27-32
- [Aquino et al., 1988](#): Aquino, D.A.; Chiu, F.-C.; Brosnan, C.F. und Norton, W.T. J. Neurochem. 51 (1988) 1085-1096
- [Araujo & Cotman, 1992](#): Araujo, D.M. und Cotman, C.W. Brain Res. 569 (1992) 141-145
- [Balasingam et al., 1994](#): Balasingam, V.; Tejada-Berges, T.; Wright, E.; Bouckova, R. und Yong, V.W. J. Neurosci. 14 (1994) 846-856
- [Ballestas & Benveniste, 1995](#): Ballestas, M.E. und Benveniste, E.N. Glia 14 (1995) 267-278
- [Banati et al., 1993](#): Banati, R.B.; Gehrmann, J.; Czech, C.; Mönning, U.; Jones, L.; König, G.; Beyreuther, K. und Kreutzberg, G.W. Glia 9 (1993) 199-210
- [Bauer et al., 1991](#): Bauer, J.; Strauss, S.; Schreiter-Gasser, U.; Ganter, U.; Schlegel, P.; Witt, I.; Volk, B. und Berger, M. FEBS Lett. 285 (1991) 111-114
- [Benveniste et al., 1989](#): Benveniste, E.N.; Sparacio, S.M. und Bethea, J.R. J. Neuroimmunol. 25 (1989) 209-219
- [Benveniste et al., 1990](#): Benveniste, E.N.; Sparacio, S.M.; Norris, J.G.; Grenett, H.E. und Fuller, G. M. J. Neuroimmunol. 30 (1990) 201-212
- [Beyreuther et al., 1986](#): Beyreuther, K.; Multhaup, G.; Simms, G.; Pottgiesser, J.; Schroeder, W.; Martins, R.N. und Masters, C.L.. Discussions in Neuroscience 3 (1986) 68-79
- [Biedler et al., 1973](#): Biedler, J.L.; Helson, L. und Spengler, B.A. Cancer Research 33 (1973) 2643-2652
- [Birnboim & Doly, 1979](#): Birnboim, H.C. und Doly, J. Nucl. Acid. Res. 7 (1979) 1513-1519
- [Borchelt et al., 1996](#): Borchelt, D.R.; Thinakaran, G.; Eckman, C.B.; Lee, M.K.; Davenport, F.; Ratovitsky, T.; Prada, C.-M.; Kim, G.; Seekins, S.; Yager, D.; Slunt, H.H.; Wang, R.; Seeger, M.; Levey, A.I.; Gandy, S.E.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; Price, D.L. und Younkin, S.G. Neuron 17 (1996) 1005-1013
- [Breitner & Folstein, 1980](#): Breitner, J.C. und Folstein, M.F. Psychol. Med. 14 (1980) 63-76

- [Bridoux et al., 1986](#): Bridoux, A.-M.; Fages, C.; Couchie, D.; Nunez, J. und Tardy, M. Dev. Neurosci. 8 (1986) 31-43
- [Busciglio et al., 1993](#): Busciglio, J.; Gabuzda, D.H. und Yankner, B.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2092-2096
- [Cai et al., 1993](#): Cai, X.-D.; Golde, T. E. und Younkin, S. G. Science 259 (1993) 514-516
- [Chao et al., 1994](#): Chao, C.C.; Hu, S.; Frey, W.H. II; Ala, T.A.; Tourtelotte, W.W. und Peterson, P.K. Clin. Diag. Lab. Immunol. 1 (1994) 109-110
- [Chartier-Harlin et al., 1991](#): Chartier-Harlin, M.; Crawford, F.; Houlden, H.; Warren, A.; Hughes, D.; Fidani, L.; Goate, A.; Rossor, M.; Roques, P.; Hardy, J. und Mullan, M. Nature 353 (1991) 844-846
- [Chen et al., 1990](#): Chen, W.-J.; Goldstein, J.L. und Brown, M.S. J. Biol. Chem. 265 (1990) 3116-3123
- [Choi-Miura et al., 1992](#): Choi-Miura, N.-H.; Ihara, Y.; Fukuchi, K.; Takeda, M.; Nakano, Y.; Tobe, T. und Tomita, M. Acta Neuropathol. 83 (1992) 260-264
- [Chung & Benveniste, 1990](#): Chung, I.Y. und Benveniste, E.N. J. Immun. 144 (1990) 2999-3007
- [Citron et al., 1992](#): Citron, M.; Oltersdorf, T.; Haass, C.; McColongue, L.; Hung, A.Y.; Seubert, P.; Vigo-Pelfrey, C.; Lieberburg, I. und Selkoe, D.J. Nature 360 (1992) 672-674
- [Citron et al., 1996](#): Citron, M.; Diehl, T.S.; Gordon, G.; Biere, A.L.; Seubert, P. und Selkoe, D.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 13170-13175
- [Citron et al., 1997](#): Citron, M.; Westaway, D.; Xia, W.; Carlson, G.; Diehl, T.; Levesque, G.; Johnson-Wood, K.; Lee, M.; Seubert, P.; Davis, A.; Kholodenko, D.; Motter, R.; Sherrington, R.; Perry, B.; Yao, H.; Strome, R.; Lieberburg, I.; Rommens, J.; Kim, S.; Schenk, D. et al. Nat. Med. 3 (1997) 67-72
- [Clark et al., 1985](#): Clark, M.J.; Gagnon, J.; Williams, A.F. und Barclay, A.N. EMBO J. 4 (1985) 113-118
- [Coleman et al., 1994](#): Coleman, R.A.; Smith, W.L. und Narumiya, S. Pharm. Rev. 46 (1994) 205-229
- [Corder et al., 1993](#): Corder, E.H.; Saunders, A.M.; Strittmatter, W.J.; Schmechel, D.E.; Gaskell, P.C.; Small, G.W.; Roses, A.D.; Haines, J.L. und Pericak-Vance, M.A. Science 261 (1993) 921-923
- [Coria et al., 1988](#): Coria, F.; Castano, E.; Prelli, F.; Larrondo-Lillo, M.; van Duinen, S.; Shelanski, M.L. und Frangione, B. Lab. Invest. 58 (1988) 454-458
- [da Cunha & Vitkovic, 1992](#): da Cunha, A. und Vitkovic, L. J. Neuroimmunol. 36 (1992) 157-169
- [Daigle & Li, 1993](#): Daigle, I. und Li, C. Proc Natl Acad Sci U S A 90 (1993) 12045-12049
- [Davis et al., 1992](#): Davis, J.B.; McMurray, H.F. und Schubert, D. Biochem. Biophys. Res. Commun. 189 (1992) 1096-1100
- [de Strooper et al., 1995](#): de Strooper, B.; Simons, M.; Multhaup, G.; Van Leuven, F.; Beyreuther, K. und Dotti, C.G. EMBO J. 14 (1995) 4932-4938
- [del Bo et al., 1995](#): del Bo, R.; Angeretti, N.; Lucca, E.; de Simoni, M.G. und Forloni, G. Neurosci. Lett. 188 (1995) 70-74
- [de Vellis, 1993](#): de Vellis, J. Neuroregeneration Gorio, A. (Hrsg.) New York Raven Press (1993) 61-75
- [Dobbenstein et al., 1979](#): Dobbenstein, B.; Garoff, H. und Warren, G. Cell 17 (1979) 759-

769

[DuBois et al., 1986](#): DuBois, J.H.; Bolton, C. und Cuzner, M.L. J. Neuroimmunol. 11 (1986) 277-285

[Duffy et al., 1980](#): Duffy, P.E.; Rapoport, M. und Graf, L. Neurology 30 (1980) 778-782

[Dyrks et al., 1988](#): Dyrks, T.; Weidemann, A.; Multhaup, G.; Salbaum, J.M.; Lemaire, H.-G.; Kang, J.; Müller-Hill, B.; Masters, C.L. und Beyreuther, K. EMBO J. 7 (1988) 949-957

[Dyrks et al., 1992](#): Dyrks, T.; Dyrks, E.; Master, C.L. und Beyreuther, K. FEBS Lett., 39 (1992) 2-24

[Dyrks et al., 1993](#): Dyrks, T.; Dyrks, E.; Mönning, U.; Urmoneit, B.; Turner, J. und Beyreuther, K. FEBS 335 (1993) 89-93

[Eder, 1997](#): Eder, J. Trends Pharmacol. Sci. 18 (1997) 319-322

[Eddleston & Mucke, 1993](#): Eddleston, M. und Mucke, L. Neurosci., 54 (1993) 15-36

[Eikelenboom & Stam, 1984](#): Eikelenboom, P. und Stam, F.C. Virch. Arch. B Cell. Pathol. 47 (1984) 17-25

[Eikelenboom et al., 1989](#): Eikelenboom, P.; Hack, C.E.; Rozemuller, J.M. und Stam, F.C. Virchows Arch. B. Cell. Pathol. 56 (1989) 259-262

[Eikelenboom et al., 1994](#): Eikelenboom, P.; Zhan, S.S.; Kamphorst, W.; van der Valk, P und Rozemuller, J.M. Virch. Arch. 424 (1994) 421-427

[Esch et al., 1990](#): Esch, F.S.; Keim, P.S.; Beattie, E.C.; Blacher, R.W.; Culwell, A.R.; Oltersdorf, T.; McClure, D. und Ward, P.J. Science 248 (1990) 1122-1124

[Estus et al., 1992](#): Estus, S.; Golde, T.E.; Kunishita, T.; Blades, D.; Lowery, D.; Eisen, M.; Usiak, M.; Qu, X.; Tabira, T.; Greenberg, H.D. und Yonkin, S.G. Science 255 (1992) 726-728

[Farlow et al., 1994](#): Farlow, M.; Murrell, J.; Ghetti, B.; Unverzagt, F.; Zeldenrust, S. und Benson, M. Neurology 44 (1994) 105-111

[Felgner et al., 1987](#): Felgner, P.L.; Gadek, T.R. Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenzel, M.; Northrop, J.P.; Ringold, G.M. und Danielsen, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 7413-7419

[Fillit et al., 1991](#): Fillit, H.; Ding, W.; Buee, L.; Kalman, J.; Altstiel, L.; Lawlor, B. und Wolf-Klein, G. Neurosci. Lett. 129 (1991) 318-320

[Fontana et al., 1982](#): Fontana, A.; Kristensen, F.; Dubs, R.; Gamsa, D. und Weber, E. J. Immunol. 129 (1982) 2413-2419

[Forloni et al., 1997](#): Forloni, G.; Mangiarotti, F.; Angeretti, N.; Lucca, E. und de Simoni, M. G. Cytok. 9 (1997) 759-762

[Frohman et al., 1989](#): Frohman, E.M.; Frohman, T.C.; Dustin, M.L.; Vayuvegula, B.; Choi, B.; Gupta, A.; van den Noort, S. und Gupta, S. J. Neuroimmunol. 23 (1989) 117-124

[Games et al., 1995](#): Games, D.; Adams, D.; Alessandrini, R.; Barbour, R.; Berthelette, P.; Blackwell, C.; Carr, T.; Clemens, J.; Donaldson, T.; Gillespie, F.; Guido, T.; Hagopian, S.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Lee, M.; Leibowitz, P.; Lieberburg, I.; Little, S.; Masliah, E. et al. Nature 373 (1995) 523-527

[Gitter et al., 1995](#): Gitter, B.D.; Cox, L.M.; Rydel, R.E. und May, P.C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 10738-10741

[Giulian & Baker, 1986](#): Giulian, D. und Baker, T.J. J. Neurosci. 6 (1986) 2163-2178

[Giulian, 1987](#): Giulian, D. J. Neurosci. Res. 18 (1987) 155-171

- [Giulian et al., 1988](#): Giulian, D.; Woodward, J.; Young, D.G.; Krebs, J.F. und Lachmann, L.B. J. Neurosci. 8 (1988) 2485-2490
- [Glenner & Wong, 1984](#): Glenner, G.G. und Wong, C.W. Biochem. Biophys. Res. Commun. 120 (1984) 885-890
- [Goate et al., 1991](#): Goate, A.; Chartier-Harlin, M.-C.; Mullan, M.; Brown, J.; Crawford, F.; Fidani, L.; Giuffra, L.; Haynes, A.; Irving, N.; James, L.; Mant, R.; Newton, P.; Rooke, K.; Roques, P.; Talbot, C.; Pericak-Vanve, M.; Roses, A.; Williamson, R.; Rossor, M.; Owen, M. und Hardy, J. Nature 349 (1991) 704-706
- [Goedert et al., 1991](#): Goedert, M.; Spillantini, M.G. und Crowther, R.A. Brain Pathol. 1 (1991) 279-286
- [Golde et al., 1990](#): Golde, T.E.; Estus, S.; Usiak, M.; Younkin, L.H. und Younkin, S.G. Neuron 4 (1990) 253-267
- [Golde et al., 1992](#): Golde, T.E.; Estus, S.; Younkin, L.H.; Selkoe, D.J. und Younkin, S.G. Science 255 (1992) 728-730
- [Goldgaber et al., 1987](#): Goldgaber, D.; Lerman, M.I.; McBride, O.W.; Saffiotti, U. und Gajdusek, D.C. Science 235 (1987) 877-880
- [Gollin et al., 1992](#): Gollin, P.A.; Kalaria, R.N.; Eikelenboom, P.; Rozemuller, A. und Perry, G. Neuroreport 3 (1992) 201-203
- [Gray & Patel, 1993a](#): Gray, C.W. und Patel, A.J. Mol. Brain Res.,. 19: (1993a) 251-256
- [Gray & Patel, 1993b](#): Gray, C.W. und Patel, A.J. Neuroreport 4 (1993b) 811-814
- [Griffin et al., 1989](#): Griffin, W.S.T.; Stanley, L.C.; Ling, C.; White, L.; MacLeod, V.; Perrot, L.J.; White, C.L. III und Araoz, C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 7611-7615
- [Griffin et al., 1995](#): Griffin, W.S.T.; Sheng, J.G.; Roberts, G.W. und Mrak, R.E. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 54 (1995) 276-281
- [Grimaldi et al., 1994](#): Grimaldi, M.; Pozzoli, G.; Navarra, P.; Preziosi, P. und Schettini, G. J. Neurochem. 63 (1994) 344-350
- [Guiroy et al., 1987](#): Guiroy, D.C.; Miyazaki, M.; Multhaup, G.; Fischer, P.; Garruto, R.M.; Beyreuther, K.; Masters, C.L.; Simms, G.; Gibbs, C.J.Jr. und Gajdusek, D.C. Proc. Natl. Acad. Sci. 84 (1987) 2073-2077
- [Haass et al., 1992](#): Haass, C.; Koo, E.H.; Mellon, A.; Hung, A.Y. und Selkoe, D.J. Nature 357 (1992) 500-503
- [Haass et al., 1993](#): Haass, C.; Hung, A.Y.; Schlossmacher, M.G.; Teplow, D.B. und Selkoe, D.J. J. Biol. Chem. 268 (1993) 3021-3024
- [Haass & Selkoe, 1993b](#): Haass, C. und Selkoe, D.J. Cell 75 (1993b) 1039-1042
- [Haass, 1997](#): Haass, C. Neuron 18 (1997) 687-690
- [Hammarstrom, 1982](#): Hammarstrom, S. Methods Enzymol. 86 (1982) 202-209
- [Hanahan, 1985](#): Hanahan, D. DNA Cloning I – A Practical Approach Glover, D.M. (Hrsg.) New York Oxford University Press/IRL Press (1985) 205-225
- [Harrison & Mobley, 1989](#): Harrison, B.C. und Mobley, P.L.. J. Neurochem. 53 (1989) 1245-1251
- [Hendriks et al., 1992](#): Hendriks, L.; van Duijn, C.M.; Cras, P.; Cruts, M.; van Hul, Q.; van Harskamp, F.; Warren, A.; McInnis, M.G.; Antonarakis, S.E.; Martin, J.; Hofman, A. und Broeckhoven, C. Nature Genet. 1 (1992) 218-221
- [Hilbich et al., 1991](#): Hilbich, C.; Kisters-Woike, B.; Reed, J.; Masters, C.L. und Beyreuther, K.

J. Biol. Chem. 218 (1991) 149-163

[Hilbich et al., 1993](#): Hilbich, C.; Mönning, U.; Grund, C.; Masters, C.L. und Beyreuther, K. J. Biol. Chem. 268 (1993) 26571-26577

[Hsiao et al., 1996](#): Hsiao, K.; Chapman, P.; Nilson, S.; Eckman, C.; Harigaya, Y.; Younkin, S.; Yang, F. und Cole, G. Science 274 (1996) 99-102

[Hu et al., 1998](#): Hu, J.; Akama, K.T.; Krafft, G.A.; Chromy, B.A. und van Eldik, L.J. Brain Res. 785 (1998) 195-206

[Irizarry et al., 1997](#): Irizarry, M.C.; McNamara, M.; Fedruchak, K.; Hsiao, K. und Hyman, B.T. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 56 (1997) 965-973

[Ishii et al., 1975](#): Ishii, T.; Haga, S. und Shimizu, F. Acta Neuropathol. (Berl.) 32 (1975) 157-162

[Itagaki et al., 1989](#): Itagaki, S.; McGeer, P.L. und Akiyama, H. J. Neuroimmunol. 24 (1989) 173-182

[Ito et al., 1989](#): Ito, S.; Narumiya, S. und Hayaishi, O. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 37 (1989) 219-234

[Ito et al., 1992](#): Ito, S.; Sugama, K.; Inagaki, N.; Fukui, H.; Giles, H.; Wada, H. und Hayaishi, O. Glia 6 (1992) 67-74

[Iwamoto et al., 1994](#): Iwamoto, N.; Nishiyama, E.; Ohwada, J. und Arai, H. Neurosci. Lett. 177 (1994) 23-26

[Jarret et al., 1994](#): Jarret, J.T.; Costa, P.R.; Griffin, R.G. und Lansbury, P.T. J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 9741-9742

[Jenkinson et al., 1989](#): Jenkinson, M.L.; Bliss, M.R.; Brain, A.T. und Scott, D.L. Br. J. Rheumatol. 26 (1989) 86-88

[Kalaria & Kroon, 1992](#): Kalaria, R.N. und Kroon, S.N. Biochem. Biophys. Res. Commun. 186 (1992) 461-466

[Kang et al., 1987](#): Kang, J.; Lemaire, H.G.; Unterbeck, A.; Salbaum, J.M.; Masters, C.L.; Grzeschik, K.H.; Multhaup, G.; Beyreuther, K. und Müller-Hill, B. Nature 325 (1987) 733-736

[Kang & Müller-Hill, 1990](#): Kang, J. und Müller-Hill, B. Biochem. Biophys. Res. Commun. 166 (1990) 1192-1200

[Katzman, 1986](#): Katzman, R. New Engl. J. Med. 314 (1986) 964-973

[Kitaguchi et al., 1988](#): Kitaguchi, N.; Takahashi, Y.; Tokushima, Y.; Shiojiri, S. und Ito, H. Nature 311 (1988) 530-532

[Klaeffki et al., 1996](#): Klaeffki, H.-W.; Wiltfang, J. und Staufienbiel, M. Analyt. Biochem. 237 (1996) 24-29

[König et al., 1992](#): König, G.; Mönning, U.; Czech, C.; Prior, R.; Banati, R.B.; Schreiter-Gasser, U.; Bauer, J.; Masters, C.L. und Beyreuther, K. J. Biol. Chem. 267 (1992) 10804-10809

[Kunkel et al., 1988](#): Kunkel, S.L.; Spengler, M.; May, M.A.; Spengler, R.; Larrick, J. und Remick, D. J. Biol. Chem. 263 (1988) 5380-5384

[Kuppner et al., 1990](#): Kuppner, M.C.; van Meir, E.; Hamou, M.F. und de Tribolet, N. Clin. exp. Immunol. 81 (1990) 142-148

[Laemmli, 1979](#): Laemmli, U.K. Nature 227 (1979) 680-685

[Le Blanc et al., 1996](#): Le Blanc, A.C.; Xue, R. und Gambetti, P. J. Neurochem. 66 (1996) 2300-2310

- [Le Blanc et al., 1997](#): Le Blanc, A.C.; Papadopoulos, M.; Bélair, C.; Chu, W.; Crosato, M.; Powell, J. und Goodyer, C.G. J. Neurochem. 68 (1997) 1183-1190
- [Levi et al., 1984](#): Levi, G.; Aloisi, F.; Ciotii, M.T. und Gallo, V. Brain Res. 290 (1984) 77-86
- [Levy et al., 1990](#): Levy, E.; Carman, M.D.; Fernandez-Madrid, I.J.; Power, M.D.; Lieberburg, I.; van Duinen, S.G.; Bots, G.T.A.M.; Luyendijk, W. und Frangione, B. Science 248 (1990) 1124-1126
- [Levy-Lahad et al., 1995](#): Levy-Lahad, E.; Wasco, W.; Poorkaj, P.; Romano, D.M.; Oshima, J.; Pettingell, W.H.; Yu, C.E.; Jondro, P.D.; Schmidt, S.O.; Wang, K. et al. Science 269 (1995) 973-977
- [Lorton et al., 1996](#): Lorton, D.; Kocsis, J.M.; King, L.; Madden, K. und Brunden, K.R. J. Neuroimmunol. 67 (1996) 21-29
- [Lorton, 1997](#): Lorton, D. Mech. Ageing Dev. 94 (1997) 199-211
- [Luber-Narod & Rogers, 1988](#): Luber-Narod, J. und Rogers, J. Neurosci. Lett. 94 (1988) 17-22
- [Ma et al., 1994](#): Ma, J.; Yee, A.; Brewer, H.B. Jr.; Das, S. und Potter, H. Nature 372 (1994) 92-94
- [Mancardi et al., 1983](#): Mancardi, G.L.; Liwnicz, B.H. und Mandybur, T.I. Acta Neuropathol. (Berl.) 61 (1983) 76-80
- [Masters et al., 1985](#): Masters, C.L.; Simms, G.; Weinmann, N.A.; Multhaup, G.; MacDonald, B.L. und Beyreuther, K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 4245-4249
- [McCarthy & DeVellis, 1980](#): McCarthy, K.D. und DeVellis J. Cell Biol. 85 (1980) 890-902
- [McGeer et al., 1989](#): McGeer, P.L.; Akiyama, H.; Itagaki, S. und McGeer, E.G. Can. J. Neurol. Sci. 16 (1989) 516-527
- [McGeer et al., 1991](#): McGeer, P.L.; Walker, D.G.; Akiyama, H.; Kawamata, T.; Guan, A.L.; Parker, C.J.; Okada, N. und McGeer, E.G. Brain Res. 544 (1991) 315-319
- [McGeer & McGeer, 1995](#): McGeer, P.L. und McGeer Brain Res. Rev. 21 (1995) 195-218
- [Meda et al., 1995](#): Meda, L.; Cassatella, M.A.; Szendrei, G.I.; Otvos, L.Jr.; Baron, P.; Villalba, M.; Ferrari, D. und Rossi, F. Nature 374 (1995) 647-650
- [Milward et al., 1992](#): Milward, E.A.; Papadopoulos, R.; Fuller, S.J.; Moir, R.D.; Small, D.; Beyreuther, K. und Masters, C.L. Neuron 9 (1992) 129-137
- [Mönning et al., 1990](#): Mönning, U.; König, G.; Prior, R.; Mechler, H.; Schreiter-Gasser, U.; Masters, C.L. und Beyreuther, K. FEBS Lett. 277 (1990) 261-266
- [Mönning et al., 1992](#): Mönning, U.; König, G.; Banati, R.B.; Mechler, H.; Czech, C.; Gehrmann, J.; Schreiter-Gasser, U.; Masters, C.L. und Beyreuther, K. J. Biol. Chem. 267 (1992) 23950-23956
- [Mönning et al., 1995](#): Mönning, U.; Sandbrink, R.; Weidemann, A.; Banati, R.B.; Masters, C.L. und Beyreuther, K. J. Biol. Chem. 270 (1995) 7104-7110
- [Müller-Hill & Beyreuther, 1989](#): Müller-Hill, B. und Beyreuther, K. Annu. Rev. Biochem. 58 (1989) 287-307
- [Mullan et al., 1992](#): Mullan, M.; Crawford, F.; Axelman, K.; Houlden, H.; Lilius, L.; Winblad, W. und Lannfelt, L. Nat. Genet. 1 (1992) 345-347
- [Murell et al., 1991](#): Murell, J.; Farlow, M.; Ghetti, B. und Benson, M.D. Science 254 (1991) 97-99
- [Naidu et al., 1995](#): Naidu, A.; Quon, D. und Cordell, B. J. Biol. Chem. 270 (1995) 369-1374

- [Namba et al., 1991](#): Namba, Y.; Tomonaga, M.; Kawasaki, H.; Otomo, E. und Ikeda, K. Brain Res. 541 (1991) 163-166
- [Nee et al., 1983](#): Nee, L.E.; Podlisky, R.J.; Elridge, R.; Weingartner, H.; Smallberg, S. und Ebert, M. Arch. Neurol. 40 (1983) 203-208
- [Neuhoff et al., 1988](#): Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D. und Ehrhard, W. Electrophoresis 9 (1988) 255-262
- [Neve et al., 1988](#): Neve, R.L.; Finch, E.A. und Dawes, L.R. Neuron 1 (1988) 669-677
- [Oltersdorf et al., 1989](#): Oltersdorf, T.; Fritz, L.; Schenk, D.B.; Lieberburg, I.; Johnson-Wood, K.L.; Beattie, E.C.; Ward, P.J.; Blacher, R.W.; Dovey, H.F. und Sinha, S. Nature 341 (1989) 144-147
- [Oltersdorf et al., 1990](#): Oltersdorf, T.; Wrad, P.J.; Henrikson, T.; Beattie, E.C.; Neve, R.; Lieberburg, I. und Fritz, L.C. J. Biol. Chem. 265 (1990) 4492-4497
- [Palmert et al., 1989](#): Palmert, M.; Podlinsky, M.; Witker, D.; Oltersdorf, T.; Younkin, L.; Selkoe, D. und Younkin, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 6338-6342
- [Panettieri et al., 1995](#): Panettieri, R.A. Jr.; Lazaar, A.L.; Puré, E. und Albelda, S.M. J. Immunol. 154 (1995) 2358-2365
- [Paresce et al., 1996](#): Paresce, D.M.; Ghosh, R.N. und Maxfield, F.R. Neuron 17 (1996) 553-565
- [Pasternack et al., 1989](#): Pasternack, J.M.; Abraham, C.R.; van Dyke, B.J.; Potter, H. und Younkin, S.G. Am. J. Pathol. 135 (1989) 827-834
- [Patterson, 1995](#): Patterson, P.H. Current Opinion in Neurobiology 5 (1995) 642-646
- [Pober et al., 1993](#): Pober, J.S.; Slowik, M.R.; de Luca, L.G. und Ritchie, A.J. J. Immunol. 150 (1993) 5114-5123
- [Ponte et al., 1988](#): Ponte, P.; Gonzalez-DeWhitt, P.; Schilling, J.; Miller, J.; Hsu, D.; Greenberg, B.; Davis, K.; Wallace, W.; Lieberburg, I.; Fuller, F. und Cordell, B. Nature 311 (1988) 525-527
- [Potter, 1992](#): Potter, H. Prog. Brain Res. 94 (1992) 447-458
- [Prelli et al., 1988](#): Prelli, F.; Castano, E.; Glenner, G.G. und Frangione, B. J. Neurochem. 51 (1988) 648-651
- [Reisberg, 1983](#): Reisberg, B. *Alzheimer's Disease, The Standard Reference* Reisberg, B. (Hrsg.) New York The Free Press (1983) 1-33
- [Robakis et al., 1987](#): Robakis, N.K.; Ramakrishna, N.; Wolfe, G. und Wisniewski, H.M. Proc. Natl. Acad. Sci. 84 (1987) 4190-4194
- [Rogers et al., 1996](#): Rogers, J.; Webster, S.; Lue, L.-F.; Brachova, L.; Civin, W.H.; Emmergling, M.; Shivers, B.; Walker, D. und McGeer, P. Neurobiol. Ag. 17 (1996) 681-686
- [Rosen et al., 1989](#): Rosen, D.R.; Martin-Morris, L.; Luo, L. und White, K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 2478-2482
- [Rozemuller et al., 1989](#): Rozemuller, J.M.; Eikelenboom, P.; Pals, S.T. und Stam, F.C. Neurosci. Lett. 101 (1989) 288-292
- [Saitoh et al., 1989](#): Saitoh, T.; Sundsmo, M.P.; Roch, J.M.; Kimura, N.; Cole, G.M.; Schubert, D.; Oltersdorf, T. und Schenk, D.B. Cell 58 (1989) 615-622
- [Sambrook et al., 1989](#): Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (Hrsg.) 2. Auflage Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)

- [Sandbrink et al., 1994](#): Sandbrink, R.; Masters, C.L. und Beyreuther, K. *Neurobiol. Dis.* 1 (1994) 13-24
- [Saunders et al., 1993](#): Saunders, A.M.; Strittmatter, W.J.; Schmechel, D.; St. George-Hyslop, P.H.; Pericak-Vance, M.A.; Joo, S.H.; Rosi, B.A.; Gusella, J.F.; Crapper-MacLachlan, D.R.; Alberts, M.J.; Hulette, C.; Crain, B.; Goldgaber, D. und Roses, A.D. *Neurology* 43 (1993) 1467-1472
- [Schägger & Jagow, 1987](#): Schägger, H. und Jagow, G.V. *Analyt. Biochem.* 166 (1987) 368-379
- [Schechter et al., 1981](#): Schechter, R.; Yen, S.-H.C. und Terry, R. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 40 (1981) 95-101
- [Schellenberg et al., 1992](#): Schellenberg, G.D.; Bird, T.D.; Wijsman, E.M.; Orr, H.T.; Anderson, L.; Nemens, E.; White, J.A.; Bonnycastle, L.; Weber, J.L.; Alonso, M.E. et. al. *Science* 258 (1992) 668-671
- [Scheuner et al., 1996](#): Scheuner, D.; Eckman, C.; Jensen, M.; Song, X.; Citron, M.; Suzuki, N.; Bird, T.D.; Hardy, J.; Hutton, M.; Kukull, W.; Larson, E.; Levy-Lahad, E.; Vitanen, M.; Peskind, E.; Poorkaj, P.; Schellenberg, G.; Tanzi, R.; Wasco, W.; Lannfelt, L.; Selkoe, D.J. und Younkin, S. *Nat. Med.* 2 (1996) 864-870
- [Schwartz & Mishler, 1990](#): Schwartz, J.P. und Mishler, K. *Cell. Mol. Neurosci.* 10 (1990) 447-457
- [Seubert et al., 1992](#): Seubert, P.; Vigo-Pelfrey, C.; Esch, F.S.; Lee, M.; Dovey, H.; Davis, D.; Shina, S.; Schlossmacher, M.; Whaley, J.; Swindlehurst, C.; McCormack, R.; Wolfert, R.; Selkoe, D.J.; Lieberburg, I. und Schenk, D. *Nature* 359 (1992) 325-327
- [Sherrington et al., 1995](#): Sherrington, R.; Rogaev, E.I.; Liang, Y.; Rogaeva, E.A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Chi, H.; Lin, C.; Li, G.; Holman, K.; Tsuda, T.; Mar, L.; Foncin, J.-F.; Bruni, A.C.; Montesi, M.P.; Sorbi, S.; Rainero, I.; Pinessi, L.; Nee, L.; Chumakov, I.; Pollen, D.; Brookes, A.; Sanseau, P. und St. George-Hyslop, P.H. *Nature* 375 (1995) 754-760
- [Shivers et al., 1988](#): Shivers, B.D.; Hilbich, C.; Multhaup, G.; Salbaum, M.; Beyreuther, K. und Seeburg, P. *EMBO J.* 7 (1988) 1365-1370
- [Shoji et al., 1992](#): Shoji, M.; Golde, T.; Ghiso, J.; Cheung, T.; Estus, S.; Shaffer, L.; Cai, X.; McKay, D.; Tintner, R.; Frangione, B. und Younkin, S. *Science* 258 (1992) 126-129
- [Siman et al., 1989](#): Siman, R.; Card, J.P.; Nelson, R.B. und Davis, L.G. *Neuron* 3 (1989) 275-285
- [Sisodia et al., 1990](#): Sisodia, S.S.; Koo, E.H.; Beyreuther, K.; Unterbeck, A. und Price, D. *Science* 248 (1990) 492-495
- [Smith et al., 1988](#): Smith, W.L.; Sonnenburg, W.K.; Watanabe, T. und Umegaki, K. *Advances in Eicosanoid Research: Eicosanoids in the Cardiovascular and Renal Systems* Halushka, P.V. und Mais, D.E. (Hrsg.) Lancaster MTP Press (1988) 232-247
- [Stopa et al., 1990](#): Stopa, E.G.; González, A.M.; Chorsky, R.; Corona, R.J.; Álvarez, J.; Bird, E.D. und Baird, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171 (1990) 690-696
- [Strittmatter et al., 1993](#): Strittmatter, E.J.; Saunders, A.M.; Schmechel, D.; Pericak-Vance, M.; Enghild, J.; Salvesen, G.S. und Roses, A.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 1977-1981
- [Studier, 1973](#): Studier, F.W. *J. Mol. Biol.* 79 (1973) 237
- [Sturchler-Pierrat et al., 1997](#): Sturchler-Pierrat, C.; Abramowski, D.; Duke, M.; Wiederhold, K.H.; Mistl, C.; Rothacher, S.; Ledermann, B.; Burki, K.; Frey, P.; Paganetti, P.A.; Waridel, C.; Calhoun, M.E.; Jucker, M.; Probst, A.; Staufenbiel, M. und Sommer, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 13287-13292

- [Suzuki et al., 1994](#): Suzuki, T.; Oishi, M.; Marshak, D.R.; Czernik, A.J.; Nairn, A.C. und Greengard, P. EMBO J. 13 (1994) 1114-1122
- [Tamaoka et al., 1994](#): Tamaoka, A.; Odaka, A.; Ishibashi, Y.; Usami, M.; Sahara, N.; Suzuki, N.; Nukina, N.; Mizusawa, H.; Shoji, S.; Kanazawa, I. und Mori, H. J. Biol. Chem. 269 (1994) 32721-32724
- [Tanzi et al., 1987](#): Tanzi, R.E.; Gusella, J.F.; Watkins, P.C.; Bruns, G.A.P.; St George-Hyslop, P.; Van Keuren, M.; Patterson, D.; Pagan, S.; Kurnit, D.M. und Neve, R.L. Science 235 (1987) 880-884
- [Tanzi et al., 1988](#): Tanzi, R.E.; McClatchey, A.I.; Lamperti, E.D.; Villa-Komaroff, L.; Gusella, J. und Neve, R.L. Nature 311 (1988) 528-530
- [Tanzi et al., 1996](#): Tanzi, R.E.; Kovacs, D.M.; Kim, T.-W.; Moir, R.D.; Guènette, S.Y. und Wasco, W. Neurobiol. Dis. 3 (1996) 159-168
- [Towbin et al., 1979](#): Towbin, H.; Strählein, T. und Gordon, T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4350
- [Trojanowski & Lee, 1994](#): Trojanowski, J.Q. und Lee, V.M.-Y. AJP 144 (1994) 449-453
- [Urmoneit, 1996](#): Urmoneit, B. Dissertation Freie Universität Berlin (Hrsg.) Berlin (1996)
- [van Duinen et al., 1987](#): van Duinen, S.G.; Castano, E.M.; Prelli, F.; Bots, G.T.A.B.; Luyendijk, W. und Frangione, B. Proc. Natl. Acad. Sci. 84 (1987) 5991-5994
- [van Nostrand et al., 1989](#): van Nostrand, W.E.; Wagner, S.I.; Suzuki, M.; Choi, B.H.; Farrow, J.S.; Geddes, J.W.; Cotman, C.W. und Cunningham, D.D. Nature 341 (1989) 546-549
- [Vaughn et al., 1991](#): Vaughn, D.M.; Rossmanith, R.C. und Cox, N.R. Soc. Neurosci. Abstr. 17 (1991) 55
- [Verbeek et al., 1994](#): Verbeek, A.M.; Otte-Höller, I.; Westphal, J.R.; Wesseling, P.; Ruiter, D.J. und de Waal, M.W. Am. J. Pathol. 144 (1994) 104-117
- [von Braunmühl, 1937](#): von Braunmühl, A. Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie Scholz, W. (Hrsg.) 13 Berlin Springer-Verlag (1937) 337-539
- [Walker & McGeer, 1992](#): Walker, D.G. und McGeer, P.L. Mol. Brain Res. 14 (1992) 106-109
- [Wasco et al., 1992](#): Wasco, W.; Bupp, K.; Magendanz, M.; Gusella, J.F.; Tanzi, R.E. und Solomon, F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 10758-10762
- [Wasco et al., 1993](#): Wasco, W.; Gurubhagavatula, S.; Paradis, M.D.; Romano, D.M.; Sisodia, S.S.; Hyman, B.T.; Neve, R.L. und Tanzi, R.E. Nature Genet. 5 (1993) 95-100
- [Weber & Osborn, 1969](#): Weber, K. und Osborn, M. J. Biol. Chem. 244 (1969) 4406
- [Weidemann et al., 1989](#): Weidemann, A.; König, G.; Bunke, D.; Fischer, P.; Salbaum, J.M.; Masters, C.L. und Beyreuther, K. Cell 57 (1989) 115-126
- [Weisgraber, 1994](#): Weisgraber, K.H. Adv. Protein Chem. 45 (1994) 249-302
- [Wiltfang et al., 1991](#): Wiltfang, J.; Arold, N. und Neuhoff, V. Electrophoresis 12 (1991) 352-366
- [Wisniewski et al., 1993](#): Wisniewski, T.; Golabek, A.; Matsubara, E.; Ghiso, J. und Frangione, B. Biochem. Biophys. Res. Commun. 192 (1993) 359-365
- [Wood et al., 1993](#): Wood, J.A.; Wood, P.L.; Ryan, R.; Graff-Radford, N.R.; Pilapil, C.; Robitaille, Y. und Quirion, R. Brain Res. 629 (1993) 245-252
- [Xiao & Link, 1998](#): Xiao, B.G. und Link, H. Neuroreport 9 (1998) 1487-1490

[Yamada & Yamanaka, 1995](#): Yamada, T. und Yamanaka, I. Neurosci. Lett. 189 (1995) 73-76

[Yasuhara et al., 1993](#): Yasuhara, O.; Muramatsu, H.; Kim, S.U.; Muramatsu, T.; Maruta, H. und McGeer, P.L. Biochem.Biophys.Res.Comm. 192 (1993) 246-251

[Yoshikai et al., 1990](#): Yoshikai, S.; Sasaki, H.; Dohura, K.; Furuya, H. und Sakaki, Y. Gene 87 (1990) 257-263

[Yoshioka et al., 1991](#): Yoshioka, K.; Miki, T.; Katsuya, T. Ogiwara, T. und Sakaki, Y. Biochem. Biophys. Res. Comm. 178 (1991) 1141-1146

[Zhong et al., 1994](#): Zhong, Z.; Higaki, J.; Murakami, K.; Wang, Y.; Catalano, R.; Quon, D. und Cordell, B. J. Biol. Chem. 269 (1994) 627-632

[Zielke et al., 1990](#): Zielke, H.R.; Tildon, J.T.; Landry, M.E. und Max, S.R. Neurochem. Res. 15 (1990) 1115-1122

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A4CT	die 100 C-terminalen Aminosäuren des APP
Abb.	Abbildung
A β	Amyloid β -Protein
Abs.	Absorption
ABTS	Azinobenzthiazolinsulfat
ACA	Amyloid der Congophilen Angiopathie
AD	Alzheimer-Demenz
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Amyloide Plaque Cores
APL	APP-ähnliches Protein (amyloid precursor like, C.elegans)
APLP	APP-ähnliches Protein (amyloid precursor like protein, Säuger)
ApoE	Apolipoprotein
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (amyloid precursor protein)
APP695	Amyloid-Vorläuferprotein (695 Aminosäuren-Isoform)
APP751	Amyloid-Vorläuferprotein (751 Aminosäuren-Isoform)
APP770	Amyloid-Vorläuferprotein (770 Aminosäuren-Isoform)
APP751sw	Amyloid-Vorläuferprotein (751 Aminosäuren-Isoform mit schwedischer Mutation)
APPL	APP-ähnliches Protein (amyloid precursor protein like, D. melanogaster)
APS	Ammoniumperoxodisulphat
AraC	Cytosin- β -D-Arabinofuranosid
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor)
Bidest	bidestilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CAMP	zyklisches Adenosin-3,5-monophosphat (cyclic adenosine-3,5-monophosphate)
CaM Kinase	Calmodulin-Kinase
Ci	Curie
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (cyclic Guanosine-monophosphate)
CMV	Cytomegalovirus
cpm	counts per minutes
CT	C-terminales Fragment des APP
d	Durchmesser
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS	Down-Syndrom
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzym-Immunoassay
ELISA	Enzym-gebundener Immunoassay (enzyme linked immunosorbent assay)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
FAD	familiäre Form der Alzheimer-Demenz
FCS	Fötales Kälberserum (foetal calf serum)
g	Gramm
GFAP	gliales saures Filamentprotein (glial fibrillary acidic protein)
HCHWA-D	hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of dutch type
HSP-27	Hitzeschock-Protein-27 (heat shock protein-27)
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (intercellular adhesion molecule-1)
IFN γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G

IL1 β	Interleukin-1 β
IL6	Interleukin-6
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton (1000 Da)
KPI	Kunitz Typ II Serin-Protease-Inhibitor
L-APP	Leukozyten-APP
LB	Luria-Bertani Medium
LDL	low density lipoprotein
LFA-1	leucocyte function antigen-1
M	Molarität (mol/l)
mA	Milliampere
MAC	macrophage antigen
MAk	monoklonaler Antikörper
MES	Morpholinethansulfonsäure
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
MG-KM	konditioniertes Medium der Mikroglia
ml	Milliliter
MLCK	myosin light chain kinase
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
NF68	Neurofilament-68
NFT	Neurofibrillenbündel (neurofibrillary tangle)
NGF	neuronaler Wachstumsfaktor (nerve growth factor)
o.g.	oben genannt
P3	postnatal, Tag 3
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered solution)
PGE	Prostaglandin E
PGD2	Prostaglandine D2
pH	potentia hydrogenii
PHF	gepaarte helikale Filamente (paired helical filaments)
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PKX	Proteinkinase X (x steht für jede beliebige Proteinkinase)
PMS	Phenazinmethosulfat
POD	Peroxidase aus Meerrettich
PS1	Presinilin 1
PS2	Presinilin 2
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDAT	Senile Demenz vom Alzheimer-Typ
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEAP	sekretorische alkalische Phosphatase
s	Sekunden
secAPP	sekretorisches APP (secretory APP)
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β	Tumorstromafaktor (transforming growth factor- β)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	tumor necrosis factor- α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen

w/v Gewicht/Volumen
ZNS zentrales Nervensystem

Aminosäure	Dreibuchstabenkode	Einbuchstabenkode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines BMBF-Projektes bei der Schering AG Berlin in der Abteilung ZNS Forschung unter der Betreuung von Dr. U. Mönning durchgeführt. Dem Projekt gehörten das ZMBH Heidelberg unter der Leitung von Prof. Dr. K. Beyreuther, die Klinik für Tumorbologie in Freiburg unter der Leitung von Prof. Marmé, das Paul Flechsig Institut der Universität Leipzig unter der Leitung von Prof. Bigl sowie das Institut für Biochemie (FU Berlin) unter der Leitung von Prof. Erdmann an.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ursula Mönning für die Betreuung meiner Arbeit, insbesondere auch für die wertvolle freundschaftliche Unterstützung. Sie hat mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat beiseite gestanden und durch viele anregende Diskussionen und Denkanstöße wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes möchte ich mich bei Dr. J.D. Turner bedanken.

Herrn Dr. Thomas Dyrks gilt mein besonderer Dank für seine immer gewährte Hilfsbereitschaft sowie für die zahlreichen Gespräche über Wissenschaft und Lebensphilosophie.

Für die freundschaftliche Zusammenarbeit und wunderschöne Arbeitsatmosphäre im Labor möchte ich mich ganz herzlich bei Michaela Kramm bedanken. Sie hat mich in jeder Hinsicht unterstützt. Geert Bodewitz danke ich für den unermüdlichen Einsatz bei immunzytochemischen Untersuchungen sowie deren Dokumentation. Herrn Dr. Hans Klaffki danke ich für die Zusammenarbeit in der A β -Analyse. Mein Dank gilt ferner allen Mitarbeitern unserer Abteilung, die mir durch ihre Aufmunterung und Hilfsbereitschaft zur Seite standen. Für die angenehme und amüsante Zusammenarbeit während unserer gemeinsamen Zeit danke ich insbesondere Bärbel Freter, Dr. Per-Olaf Scheel und Petra Marten.

Zum Schluß möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meinem Lebensgefährten Torsten Schaenke bedanken, die mich während meines gesamten Studiums in jeder Hinsicht unterstützt und aufgemuntert haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Michaela Kernekewisch
geb. 21.09.1967 in Berlin
ledig, keine Kinder

Schulausbildung

1975 – 1978	Stechlinsee-Grundschule Berlin
1978 – 1980	Fläming-Grundschule Berlin
1980 – 1988	Rheingau-Gymnasium Berlin, Abschluß : Abitur

Studium

Nov. 1988 – Apr. 1989	Vorpraktikum am Institut für Angewandte Genetik FU Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schieder, Fachbereich Biologie
1989 – 1993	Studium der Biotechnologie an der Technischen Fachhochschule Berlin Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der Humboldt Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Dr. Bürger <i>THEMA : „ZELLWANDPOLYSACCHARIDE BEI VERGRÜNENDEN STREPTOKOKKEN – BINDUNG VON C-REAKTIVEM PROTEIN UND EINFLUß AUF DIE PHAGOZYTÖSE“</i> Abschluß : Diplom-Ingenieur (FH)
Dez.1993 – Jan.1995	Weiterführende Arbeiten zum Diplomarbeitsthema am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der Humboldt Universität Berlin (Charité Berlin)
seit Febr. 1995	Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. U. Mönning bei der Schering AG Berlin, Abteilung ZNS-Forschung <i>THEMA: „UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION DES INTER-ZELLULÄREN ADHÄSIONSMOLEKÜLS ICAM-1 UND ZUR PROZESSIERUNG DES AMYLOID-VORLÄUFERPROTEINS APP IN ASTROZYTEN“</i>

Berlin, den 18.09.1998

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Berlin, den 18.09.1998

Michaela Kernekewisch